

المملكة العربية السعودية
المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني
الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج



تخصص تقنية التصنيع الغذائي

الأحياء الدقيقة في الأغذية

(عملي)

126 صنع

طبعة ١٤٢٩ هـ

مقدمة

الحمد لله وحده، والصلاة والسلام على من لا نبي بعده، محمد وعلى آله وصحبه، وبعد:

تسعى المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني لتأهيل الكوادر الوطنية المدربة القادرة على شغل الوظائف التقنية والفنية والمهنية المتوفرة في سوق العمل، ويأتي هذا الاهتمام نتيجة للتوجهات السديدة من لدن قادة هذا الوطن التي تصب في مجملها نحو إيجاد وطن متكامل يعتمد ذاتياً على موارده وعلى قوة شبابه المسلح بالعلم والإيمان من أجل الاستمرار قدماً في دفع عجلة التقدم التنموي لتصل بعون الله تعالى لمصاف الدول المتقدمة صناعياً.

وقد خطت الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج خطوة إيجابية تتفق مع التجارب الدولية المتقدمة في بناء البرامج التدريبية، وفق أساليب علمية حديثة تحاكي متطلبات سوق العمل بكافة تخصصاته لتلبي متطلباته، وقد تمثلت هذه الخطوة في مشروع إعداد المعايير المهنية الوطنية الذي يمثل الركيزة الأساسية في بناء البرامج التدريبية، إذ تعتمد المعايير في بنائها على تشكيل لجان تخصصية تمثل سوق العمل و المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني بحيث تتوافق الرؤية العلمية مع الواقع العملي الذي تفرضه متطلبات سوق العمل، لتخرج هذه اللجان في النهاية بنظرة متكاملة لبرنامج تدريبي أكثر التصاقاً بسوق العمل، وأكثر واقعية في تحقيق متطلباته الأساسية.

وتتناول هذه الحقيبة التدريبية " الأحياء الدقيقة في الأغذية -عملي " لمتدربي قسم" تقنية التصنيع الغذائي " للكليات التقنية موضوعات حيوية تتناول كيفية اكتساب المهارات اللازمة لهذا التخصص.

والإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج وهي تضع بين يديك هذه الحقيبة التدريبية تأمل من الله عز وجل أن تسهم بشكل مباشر في تأصيل المهارات الضرورية اللازمة، بأسلوب مبسط يخلو من التعقيد، وبالاستعانة بالتطبيقات والأشكال التي تدعم عملية اكتساب هذه المهارات.

والله نسأل أن يوفق القائمين على إعدادها والمستفيدين منها لما يحبه ويرضاه، إنه سميع مجيب الدعاء.

الإدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج

تمهيد

عرف تأثير الميكروبات منذ قديم الزمان حيث حفظ الإنسان القديم غذاءه من الفساد بطرق عديدة كالتجفيف والتمليح، ولكن علم الميكروبيولوجيا بوضعة الحالي يعتبر من العلوم الحديثة التي برزت إلى العالم منذ حوالي قرن ونصف تقريبا ، وهذا العلم يعنى بدراسة الأحياء الدقيقة عموما من حيث الشكل والتركيب والخواص الفسيولوجية والمزرعية وأهميتها من الناحية الطبية والزراعية والتصنيعية.

ولقد حدث تطور سريع لهذا العلم في السنين الأخيرة، وأصبح له أهمية كبرى في حياة الإنسان ورفاهيته، وليس أدل على ذلك من استغلال الميكروبات في كثير من الصناعات الغذائية مثل صناعة الألبان ومنتجاتها ، التخمرات المختلفة، كما أمكن إنتاج الفيتامينات والإنزيمات والأحماض العضوية وغيرها من المنتجات الهامة واللازمة لكثير من الصناعات.

ولقد وضعة هذه الحقيبة كمقرر تدريبي لمتدربي قسم تقنية التصنيع الغذائي وروعي فيها الآتي:

1- التعرف على مصادر التلوث.

2- التعرف على شكل المستعمرات البكتيرية والخمائر والفطريات.

3- دراسة بعض الاختبارات التي تجرى على بعض المنتجات الغذائية للتأكد من مدى صلاحيتها للاستهلاك الآدمي.

4- دراسة بكتريولوجيا المياه، والتعرف على كيفية معرفة التلوث من عدمه.

5- ميكروبيولوجيا الأغذية والتو كسينات الميكروبية.

6- ميكروبيولوجيا الألبان والميكروبات المرضية باللبن.

7- البيئات والمحاليل والأدلة المستخدمة في إجراء الاختبارات اللازمة للكشف والتعرف على الأحياء الدقيقة.

وإننا لنرجو أن تكون هذه الحقيبة مرجعا وافيا لمتدربي قسم تقنية التصنيع الغذائي. ولقد راعينا أن تشمل هذه الحقيبة أحدث الطرق المستعملة في دراسة الميكروبيولوجيا من الناحية العلمية، كما زودناه بكثير من الأشكال والجداول التي تفيد في الحياة العملية.

والله ولى التوفيق.

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الاحتياطات الواجب اتباعها

الاحتياطات الواجب اتباعها

1

الاحتياطات الواجب اتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة في الأغذية

1- يمنع التدخين أو الأكل أثناء العمل وبالمختبر حيث ان أيدي القائمين بالعمل من حيث نزع السدادات القطنية أو رج العينات أو أخذ العينة بواسطة الماصات قد تتلوث بالبكتريا وعليه فإن التدخين أو الأكل بمثل هذه الأيدي هي إحدى وسائل نقل البكتريا إلى الإنسان وجهازه الهضمي أو التنفسي.

2- يجب تجنب وضع الماصات المستعملة على المنضدة أو لمس هذه الماصات باليد حيث أن سطحها الخارجي دائما وأبدا ما يكون ملوثاً بالميكروبات التي نقلناها بها.

3- يجب أن تكون سطوح طاولات المختبر ملساء وذلك لسهولة وفعالية تعقيمها.

4- يجب غسل الأيدي بمحلول مطهر أو بالماء والصابون جيداً وتجفيفها ويجب أن تكون الأيدي جافة أثناء العمل

5- يستعمل خلاط ذو غطاء محكم دائما لخلط العينات حتى يتجنب نثر أجزاء من العينة بالعمل والتي قد تكون إحدى مسببات الأمراض.

6- يجب تغطية منطقة العمل على طاولات المختبر بأوراق لها قابلية الامتصاص أينما يكون احتمال انسكاب المحاليل التي تحوي البكتريا المرضية أو سمومها.

7- تغمر كافة الماصات التي استخدمت في نقل مواد العدوى أو السموم أو الميكروبات في محلول معقم وقاتل للأحياء الدقيقة ومن ثم تنقل إلى محلول الغسيل وأخيراً بواسطة جهاز التعقيم تحت درجات عالية مع كافة اللوازم المستخدمة لتلك الأعمال ومن ضمنها بالطو المعمل

التعرف على الأجهزة المستخدمة في مختبر الأحياء الدقيقة

الكائنات الحية الدقيقة هي مجموعة من الكائنات الحية متناهية في الصغر لاترى بالعين المجردة حيث يقل حجمها إلى درجة لا تستطيع معها العين المجردة رؤيتها، وهي عامة تتكون من خلية واحدة تقوم بجميع الوظائف الحيوية(الحركة، التنفس، التغذية، الإخراج- الخ) لما كانت الكائنات الحية الدقيقة لا يمكن مشاهدتها بالعين المجردة، ومع عظم تأثيرها على الإنسان سواء بالنفع أو بالضرر فكان لا بد من العمل على إيجاد الأجهزة والوسائل التي تمكننا من دراسة هذه الكائنات الحية.

أنواع الأحياء الدقيقة:

1- البكتريا
2- الخمائر
3- الفطريات
4- الفيروسات

وتختلف هذه الكائنات الحية في أنواعها وتركيبها وصفاتها، حيث منها النافع للإنسان مثل بكتريا التخمر(صناعة منتجات الألبان، منتجات الخبيز)، ومنها ما هو ضار مثل البكتريا المسببة للفساد الغذائي، والمسببة للتسمم الغذائي

(1) الميكروسكوب المركب:

يستخدم للتعرف على الكائنات الحية الدقيقة حيث يقوم بتكبير صورتها بما يمكننا من دراستها والتعرف على صفاتها، وكيفية الاستفادة منها.

تركيب الميكروسكوب المركب:-

1- العدسة العينية: Eye piece وهي التي تثبت في الطرف العلوي في أنبوب السحب، وهي عبارة عن عدسة مركبة(أي تتكون من مجموعة من العدسات).

2- **العدسة الشيئية:** Objective piece وهى التي تثبت في الطرف السفلي في أنبوب السحب، وهى عبارة عن عدسة مركبة(أي تتكون من مجموعة من العدسات) وهذه العدسات ذات قوة تكبيرية مختلفة.

3- **المسرح:**حيث توضع عليها الشرائح ومزودة بفتحة في مركزها ليمر فيها الضوء، وذلك حتى تكون الصورة واضحة.

4- **مصدر للإضاءة:** عبارة عن مصدر للضوء طبيعي أو مصدر كهربي.

5- **المكثف:** يتم عن طريقه التحكم في قوة الإضاءة.

والشكل التالي يوضح فيه الميكروسكوب المركب.

العدسة العينية

العدسات الشيئية

المسرح

المكثف

مصدر الإضاءة

(2) الأوتوكلاف (المعقم)

إن معظم الدراسات الميكروبيولوجية تعتمد على المزارع النقية أي التي ينمو بها نوع واحد من الكائنات الدقيقة، وهذه تتطلب لنموها بيئات غذائية معقمة. والتعقيم عبارة عن العمليات التي من شأنها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة وأماكن أو مسطحات محدودة في أبعادها وأحجامها. والأشياء المعقمة يمكن الاحتفاظ بها على صورة معقمة طالما أمكن المحافظة عليها من التلوث الخارجي وعادة يتم التعقيم باتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية. ومن هذه الطرق هي استخدام الأوتوكلاف.

جهاز الأوتوكلاف

عبارة عن أسطوانة معدنية عادة تصنع من الصلب أو من سبائك معدنية قوية تتحمل ضغط قد تصل إلى30 رطل/ بوصة^{2} على الأقل، له غطاء يقفل بإحكام بعد أن توضع به المواد المراد تعقيمها، وبعد التأكد من احتواء الجهاز على الماء إلى الارتفاع المناسب مع ترك الصنبور مفتوحا ثم يوصل التيار الكهربي ويدفع به بخار الماء، وعندما يشاهد البخار خارجا بشدة من الصنبور فإن هذا يعني خلو الجهاز من الهواء وامتلائه بالبخار. عندئذ يقفل الصنبور جيدا ويترك البخار ينضغط بداخل الجهاز حتى يصل إلى الضغط المطلوب وهو15 رطل/ بوصة^{2}ويعرف ذلك بالاستعانة بالمانومتر المتصل بالجهاز.وبالتالي يصل درجة الحرارة إلى 6و121 مْ وعند هذه الدرجة يحسب وقت التعقيم الذي يختلف باختلاف طبيعة المواد وحجم المواد المراد تعقيمها. بعد انتهاء مدة التعقيم يغلق الجهاز ويترك دون فتح حتى ينخفض الضغط بداخل الجهاز.والشكل التالي يوضح صورة للاوتوكلاف.



صورة جهاز الأوتوكلاف

3- الحضان الكهربائي **Microbiological** incubator

هو جهاز يستخدم في تنمية البيئات الملقحة وذلك عن طريق التحكم في درجة الحرارة بواسطة الترموستات.



4- المجفف الكهربائي Drying oven

جهاز يستخدم لتجفيف العينات، الأدوات المستخدمة وذلك للتخلص من أكبر قدر من الرطوبة.



الأحياء الدقيقة في الأغذية

مصادر التلوث في الأغذية

الجدارة: التعرف على مصادر التلوث في الأغذية (التربة- الهواء- الماء- الإنسان- الكائنات الحية).

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على مصادر التلوث المختلفة بعد إجراء الاختبارات الميكروبيولوجية

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة الى التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

التدريب العملي الأول

انتشار الأحياء الدقيقة في الطبيعية (مصادر تلوث الغذاء)

البيئات المطلوبة :

1- بيئة الأجار المغذي Nutrient agar

تستخدم هذه البيئة للحصول على مجاميع معزولة من البكتريا ، وهي تعتبر من أكثر البيئات الصلبة شيوعا في الأعمال البكتريولوجية. وهى عبارة عن بيئة المرق المغذي مضافا إليها الأجار.

الأدوات والمواد اللازمة لتحضير البيئة

1- لتر مرق مغذي بدون ضبط الـ pH.

2- أجار أجار.

3- حلة ذات جدارين أو حمام مائي.

4- دليل بروم ثيمول الأزرق.

5- صندوق مقارنة الألوان.

6- محلول ص أ يد 1, ع، 9 ,ع.

7- ماصات- سحاحات– أقماع- أنابيب اختبار- أطباق بتري معقمة- سدادات قطنية.

طريقة العمل

1- تحضير المرق المغذي والذي يتكون من

مستخلص لحم3جم، ببتون10جم، وماء مقطر1000مل.

أ- إذابة المكونات في الماء ثم الغلي في حمام مائي ويضبط الـ pH إلى7.

ب- الترشيح ثم التعبئة في أنابيب والتعقيم في الأوتوكلاف على121°م وتحت ضغط 15 رطل/ بوصة مربعة ولمدة 15دقيقة.

2- يوضع لتر من المرق المغذي في الحلة ذات الجدارين ويضاف إليه 15جم أجار أجار (الأجار بنسبة 1,5- 2٪).

3- تغلى البيئة حتى يذوب الأجار.

4- إضافة قليلا من الماء لتعويض الفاقد بالتبخير.

5- ضبط الـ pH إلى7.

6- ترشيح البيئة وهى ساخنة في مرشح بوخنر مع استعمال ورق ترشيح مفتت في ماء ساخن وعلى شكل طبقة بين ورقتي ترشيح في هذا المرشح.

طريقة عمل الاختبار

1. سيح بيئة الأجار المغذي على درجة100°م ثم يبرد إلى درجة45°م قبل صب الأطباق.
2. صب أطباق بتري المعقمة بالأجار ويوزع الأجار في هذه الأطباق, وذلك بتحريك الطبق حركة دائرية بسيطة باتجاه عقرب الساعة وبعكسه, إلى الأمام وإلى الخلف بحيث ينتشر الأجار ويتوزع توزيعاً منتظماً ويراعى عدم التحريك بقوة حتى لا يتلوث غطاء الطبق بالأجار.
3. يترك الطبق ليبرد الأجار ويصلب.
4. **بعد صلابة الأجار يجرى ما يلي:**

أ)ينثر قليل من التربة على سطح الأجار.

ب)بأيدي أحد العمال يمسح سطح الأجار.

ت)بأحد الأوعية أو الأواني المستعملة يلمس سطح الأجار.

ث)تنثر بعض العلائق على سطح الأجار

ج)يترك أحد الأطباق لمدة نصف ساعة مكشوفة للهواء.

ح)يكتب على غطاء الطبق نوع المعاملة.

خ)يقلب الطبق بحيث يصير الغطاء إلى لأسفل والقاع إلى الأعلى حتى لا تتساقط قطرات الماء المتكشف في الغطاء على سطح الأجار فيعمل ذلك على تداخل المجاميع البكتيرية فلا يمكن تمييزها.

د)توضع الأطباق بهذه الصورة في الحضان Incubator على درجة37 ^{o}م لمدة 48 ساعة ثم يلاحظ أشكال وأنواع المجاميع النامية على سطح هذا الأجار.

ذ) بعدذلك تفحص كل مجموعة على حدة وذلك بعد معرفة لون وشكل وسطح ونوع الحافة وانتشار هذه المجاميع وذلك بصبغها بطريقة جرام وفحصها ميكروسكوبيا.

التدريب العملي

أمامك بيئة الأجار المغذى والمطلوب اتباع الخطوات المذكورة سابقا لإجراء الاختبار، ثم دون النتائج في الجدول التالي:

م	نوع التلوث	اللون	الشكل	شكل السطح	نوع الحافة	الانتشار
1	التربة					
2	لمس أحد العمال					
3	مسح الأواني					
4	نثر بعض العلائق					
5	النفخ في الطبق					
6	ترك طبق معرض للهواء الجوي 30 ق					
7	مسح الطاولة					
8	طبق بدون معاملة					

أسئلة

س1 :أكمل العبارات التالية:

1- تتكون بيئة المرق المغذى من- - - - - - - - ، - - - - - - ، - .

2- يجب ضبط الـ pH لبيئة المرق المغذى عند- -

3- ترشح البيئة وهى ساخنة بواسطة -

4- تعقم البيئة على درجة حرارة- - - - - - - - - - - وتحت ضغط- - - - - - - - - - - - - ولمدة- -

5- يتم التحضين على درجة حرارة- -

س2 :اذكر مصادر التلوث؟ مع ذكر مثال على كل نوع؟

- -
- -
- -
- -
- -
- -
- - - - - - -

س3: حاول رسم الأشكال التي حصلت عليها بعد الاختبار؟

- -
- -
- -
- -
- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

مواصفات المستعمرات البكتيرية

الجدارة: التعرف على المواصفات الخاصة بالمستعمرات البكتيرية.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتدريب على كيفية تحضير البيئات وتعقيمها جيدا.

2- أن يقوم المتدرب بالتعرف على شكل المستعمرات البكتيرية ووصفها باستخدام الميكروسكوب المركب.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان.

الوسائل المساعدة

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة إلى التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

مواصفات المستعمرات البكتيرية

تنمى البكتريا عادة على بيئات خاصة وتستعمل البيئة لأغراض عديدة فتستعمل لحفظ الميكروب واستكثاره ودراسة خواصه الفسيولوجية وتشجيعه على إنتاج مواد تستعمل في الأغراض الصناعية كإنتاج الكحولات والأحماض العضوية وخلافة.

والتدريب التالي يعطينا معلومات حول هذه المستعمرات البكتيرية من حيث:

1- **الشكل:** دائري- اهليجي- مغزلي- مثلث الأقسام- قوقعي- غير منتظم- شكل الوردة- جذري- خيطي(شكل8).

2- **التركيب:** حبيبي- متراكم- حبيبي خشن- ذو مناطق دائرية- شبكي- مغصن- مجعد- به مجاميع ثانوية.

3- **الحافة:** كاملة- هدبية- متموجة- مفصصة- ممزقة.

4- **الارتفاع:** مسطح- قطري- مرتفع- مدرج- محدب.

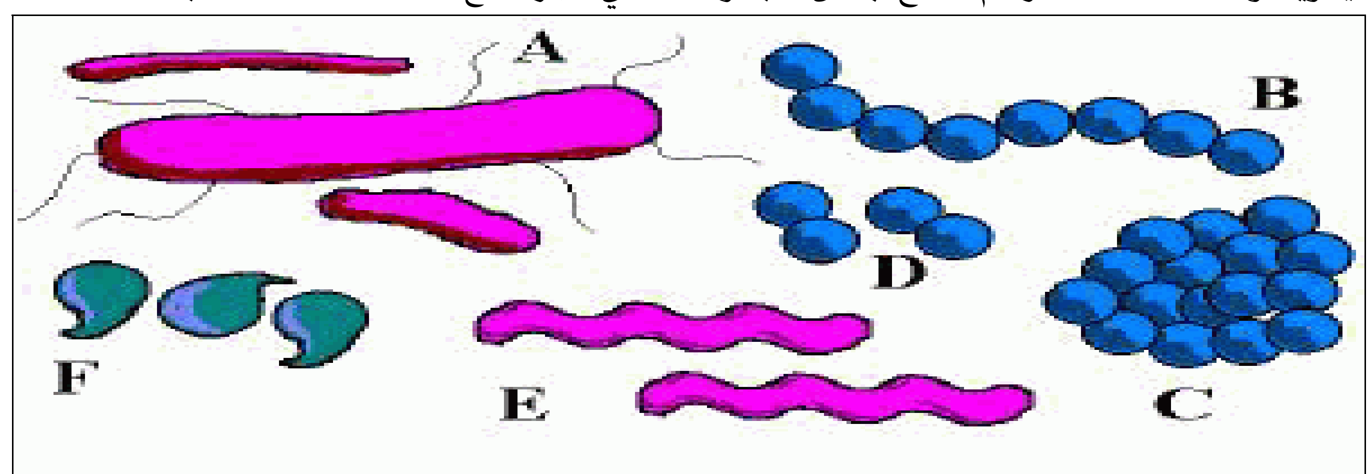
5- **القوام:** هش- صلب- لزج- مائي- ثقيل.

6- **اللون:** لون المجموعة ولون البيئة حولها.

7- **الشفافية:** نصف شفاف- معتم- شفافة.

8- **الانتشار:** لا حظ ما إذا كانت المجموعة منتشرة على سطح البيئة أو محدودة.

9- **الحجم:** يقاس قطر بعض المجاميع بالملليمتر في طبق يحتوي على عدد منها وتختلف المجاميع من حيث الحجم وقد يكون بعضها صغيراً جداً يكاد يرى بالعين المجردة وفي هذه الحالة تفحص المجاميع بالعدسة اليدوية أو الـ Binocular ارسم نماذج لبعض المجموعات التي ظهرت مع ملاحظة النقط السابقة.



شكل(8)أشكال البكتريا

نمو البكتريا والتغيرات الكيماوية الحيوية التي تحدثها في البيئات العادية.

البيئات والأدوات والمواد اللازمة :

1- **بيئة المرق المغذي** Nutrient broth

أ- مكونات البيئة: مستخلص لحم3جم، ببتون10جم، ماء مقطر1000سم٣.

ب- طريقة التحضير:

1- خلط المكونات.

2- غلي المكونات في الحمام المائي.

3- يسخن الحمام المائي حتى الغليان مع ملاحظة أن يجب تعويض النقص في الماء نتيجة التبخير.

4- تترك البيئة حتى تبرد ، ثم ضبط الـ pH الى7أو7,2.

5- الترشيح باستعمال مرشح بوخنر.

6- تعبئة البيئة في أنابيب أو دوارق مناسبة وتغطى بسدادات قطنية ثم تعقم في الاوتوكلاف على درجة حرارة121 مْ وتحت ضغط15 رطل/ بوصة مربعة ولمدة15 دقيقة.

2- **بيئة الجيلاتين المغذى** Nutrient gelatin broth

الأدوات والمواد اللازمة:

لتر مرق مغذي بدون ضبط الرقم الأيدروجينى- جيلا تين، حمام مائي- دليل بروم ثيمول الأزرق- محلول هيدروكسيد الصوديوم 0,9ع، 0, 1ع- صندوق مقارنة الألوان- ماصات- سحاحات- أنابيب اختبار- قمع ترشيح- قطن.

طريقة التحضير:

1- ضع المرق المغذى في الحمام المائي ثم أضف إليه الجيلاتين بنسبة 15٪.

2- سخن البيئة حتى يذوب الجيلاتين.

3- أضف الماء لتعويض الفاقد بالتبخير.

4- اضبط الـ pH الى7.

5- رشح البيئة وهى ساخنة في قمع بوخنر.

6- املأ الأنابيب بحوالي7سم٣لكل أنبوبة ثم أقفلها بالسدادات القطنية.

7- عقم في جهاز الأوتوكلاف بالتعقيم المتقطع مدة20 دقيقة على3أيام متتالية.

3- **بيئة الأجار المغذى المائل** Nutrient agar broth slant

التحضير مثل بيئة الأإجار الصلبة فيما عدا عند التعبئة تعبأ كل أنبوبة بواقع 5 مل ثم تعقم وبعد خروجها من جهاز الأوتوكلاف توضع في وضع مائل حتى يتصلب الاجار.

4- **بيئة لبن دوار الشمس** Litmus milk

الأدوات والمواد اللازمة:

لبن فرز(مجفف) 100جم، دليل عباد الشمس1 جم، ماء مقطر1000 مل

تخلط المكونات معا ثم التعقيم في جهاز الأوتوكلاف على درجة حرارة121ْ م، لمدة20 دقيقة ولمدة3أيام متتالية.

5- **بيئة أجار الجلوكوز العميق**

وتحضر كالآتي:

01يحضر1 لتر من بيئة الأجار المغذى المتعادل والمرشح.

02إضافة10جم جلوكوز.

03التعبئة في أنابيب وتعقم في جهاز الأوتوكلاف تعقيما متقطعا121 مْ لمدة20 دقيقة يوميا لمدة3 أيام متتالية.

6- المزارع السابقة التي حصلت عليها من الدرس السابق.

طريقة العمل

01لقح مجموعة البيئات السابقة بكل نوع من المزارع على حدة

02تحضن البيئات السابقة على درجة22 مْ لمدة شهر وصف على فترات (يومياً في الأسبوع الأول مرتين أسبوعياً في المدة الباقية) ما تحدثه الميكروبات في كل من البيئات السابقة على النحو التالي:

1- بيئة المرق المغذي:

- لاحظ تكوين غشاء على السطح وهل الغشاء مجعد أم أملس أم جلدي أم حلقي وهل الغشاء تحت السطح أم فوق السطح.
- لاحظ ما إذا كانت البيئة عكرة أو رائقة, هل يوجد راسب أم لا. اختبر قوام البيئة لوجود لزوجة من عدمه باستعمال إبرة التلقيح.
- اختبر الرقم الأيدروجيني للبيئة وقارن ذلك ببيئة غير ملقحة.

2- بيئة الجيلاتين المغذي

- تلقح هذه البيئة بطريقة الوخز وتحضن وفي حالة عدم إسالة الجيلاتين يلاحظ شكل النمو فقد

- يكون على هيئة كرات صغيرة متصلة. خيطي- سبحي- معرج- هدبي- شجري.
- وفي حالة إسالة الجيلاتين لاحظ شكل الإسالة فقد يكون إبريقي- فنجاني.

3- بيئة الأجار المغذي المائل

- لاحظ اللون واللمعان والقوام والشفافية ولون البيئة.

4- بيئة لبن تباع الشمس:

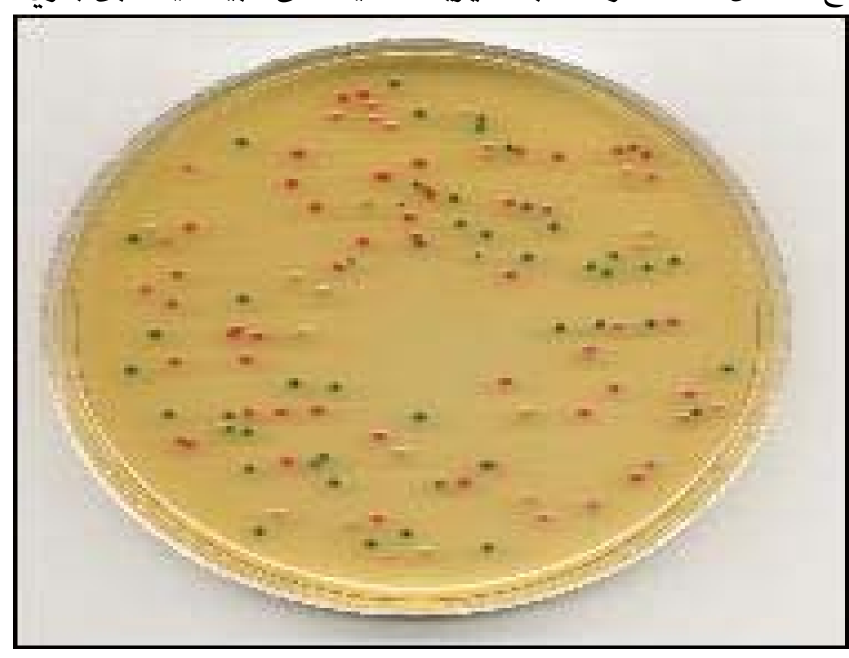
لاحظ التغيرات الآتية:

- لا تتغير في المظهر.
- تجبن.
- تجبن مع ظهور الشر ش.
- إذابة الخثرة لاحظ لون دليل تباع الشمس كما لاحظ تكوين فقاقيع غازية من عدمه.

5- بيئة أجار الجلوكوز العميق

- لقح هذه البيئة بالوخز.
- لاحظ شكل النمو مثل في بيئة الجيلاتين.
- لاحظ مكان النمو فقد يكون سطحياً (هوائي) أو داخل البيئة عند القاعدة فيكون (لا هوائي) أو في البيئة عموماً فيكون لا هوائيا اختيارياً.

والشكل التالي يوضح شكل المستعمرات البكتيرية النامية على البيئة في طبق بتري.(شكل3)



شكل(3) يبين شكل البكتريا النامية في طبق بتري.

التدريب العملي

أمامك البيئات التي قمت بتحضيرها وهى:-

1- بيئة المرق المغذي.
2- بيئة الجيلاتين المغذي.
3- بيئة الأجار المغذي المائل.
4- بيئة لبن دوار الشمس.
5- بيئة أجار الجلوكوز العميق.

والمطلوب اتباع الخطوات التي ذكرت وتدوين النتائج في الجدول التالي:

م	نوع البيئة	تكوين الغشاء	حالة البيئة		رقم الـ pH	شكل النمو	اللون	اللمعان	القوام	الشفافية	التجبن
			رائقة	عكرة							
1	المـــــرق المغذى										
2	الجيلاتين المغذى										
3	الأجار المغذى المائل										
4	لبن دوار الشمس										
5	أجار جلوكوز عميق										

أسئلة

س1 : ضع علامة(✓) أو (X) أمام العبارات التالية مع تصحيح الخطأ :

1- ليس من أشكال البكتريا الشكل الدائري ( )

- -

2- يجب ضبط الـ pH في بيئة المرق المغذى عند pH=5 ( )

- .

3- تعقم البيئة على درجة حرارة37 مْ ( )

- -

4- يستخدم جهاز الحضان في ضبط حموضة البيئة ( )

- -

5- يضاف دليل البروموثيمول الأزرق إلى بيئة أجار الجلوكوز العميق. ( ).

- -

س2: ما هو السبب في إضافة دليل دوار الشمس إلى البيئة؟

- -

- -

- -

س3: ما فائدة كل من:

1- قمع بوخنر:- -

- -

2- محلول هيدروكسيد الصوديوم 1و0 عياري:- - - - - - - - - - - - - - - -

- -

3- الحمام المائي:- -

- -

4- الماصات:- -

- -

- -

5- المعقـــم: -
- -
- -

6- الحـضان:- -
- -
- -
- -

7- المجفـف:- -
- -
- -

8- دليل بروموكريزول بربل:- -
- -
- -
- -

9- بيئة لـبن دوار الـشمس:- -
- -
- -
- -

10- أطبـاق بـتري:- -
- -
- -
- -
- -

11- إبرة التلقيح:- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الفطريات في الأغذية

الجدارة: التعرف على المواصفات الخاصة بالفطريات.

الأهداف1

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على مصادر التلوث المختلفة بعد إجراء الاختبارات الميكروبيولوجية

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان.

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الفطريات في الأغذية

الفطريات تنمو على الطعام و يعرف ذلك بمظهرها الزغبي أو الوبري أو القطني التي تتلون في بعض الأحوال، وقد يتغير لونها إلى اللون الداكن، واللون ينتج لتكشف الجراثيم الملونة وظهورها على السطح الذي ينمو عليه الفطر، وعادة الغذاء المصاب بالعفن هذا يكون غير صالح للأكل

عموماً تنتشر الفطريات على نطاق واسع في الجو وفي الأطعمة وخاصة بالأطعمة الحامضية منها وإذا تركت الفطريات بهذه الأطعمة فأنها تنمو على سطحها وتسبب فسادها.

الأدوات والمواد المستعملة:

1- بيئة أجار المولت Malt agar

1- مكونات البيئة: مستخلص المولت30جم،أجار20جم، ماء مقطر1000مل.

تحضير البيئة:

1- تغلي المكونات في حمام مائي بعد خلطها (لإذابة الاجار).

2- ضبط الـ pH إلى5,5.

3- الترشيح والتعبئة والتعقيم في جهاز الأوتوكلاف على121 مْ وتحت ضغط 15 رطل/ بوصة مربعة ولمدة 15 دقيقة.

2- بيئة المولاسا الصلبة:

مكونات البيئة:

عسل أسود20 جم، أجار20جم، مرق مغذي960 مل.

طريقة التحضير:

1- تغلي المكونات بعد خلطها في حمام مائي.

2- ضبط الـ pHإلى5,5.

3- الترشيح والتعبئة والتعقيم في جهاز الأوتوكلاف لمدة 20دقيقة ولمدة 3 أيام متتالية.

3- **محلول لاكتوفينول** Lactophenol solution

يتكون محلول اللاكتوفينول من: بلورات الفينول20 جم، حامض لاكتيك20 جم، جليسرين،

40 جم، ماء مقطر40 مل. وتخلط المكونات وتحفظ في زجاجات بنية اللون.أطباق بتربة معقمة.

طريقة العمل:

1- سيح أنابيب أجار المولت وصبها في الأطباق.

2- بعدأن تجمد البيئة افتح بعض الأطباق وعرضها للهواء مدة5–10 دقائق. ثم اقلب الأطباق واتركها على درجة حرارة المعمل لمدة أسبوع

3- خذ خمس إبر من كل من الجبن والزبد والشراب والمربى...الخ التي أمامك, ثم لقح بها الأطباق المحتوية على البيئة والمحضرة كما في رقم(1) وذلك بطريقة التخطيط ثم اتركها على درجة حرارة المعمل للأسبوع القادم.

4- لاحظ نمو مجاميع الفطريات بالأطباق ثم خذ بالإبرة المعقمة المبللة بمحلول جليسرين جزءا من الفطر. يحتوي على ميسليوم وحامل الجراثيم والجراثيم.

5- ضع هذا الجزء في نقطة من محلول اللاكتوفينول على شريحة زجاجية وغطه بغطاء الشريحة ثم افحصها بالعدسة الصغرى ثم الكبرى. ارسم ما تراه وحاول تعيين نوع الفطر ولاحظ الآتي:

أ- **الميسليوم:**

مقسم أو غير مقسم.

ب- **الجراثيم غير التزاوجية:**

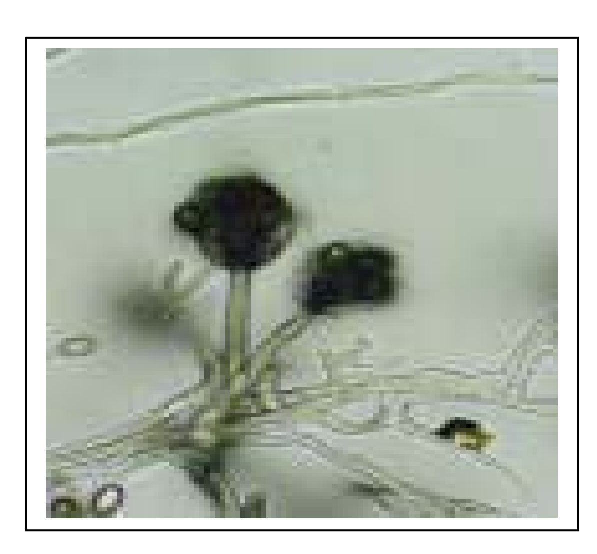
كويندات أو سيرانجيوسبورز حجمها, لونها, شكلها, إذا كانت خشنة أو مسننة, تركيبها خلية واحدة أو اثنين أو أكثر.

ج- **أجسام ثمرية:**

- إذا كانت سبورانجيوم لاحظ الحجم, اللون والشكل والموضع.
- إذا كانت تحمل كويندات إذا ما كانت واحدة أو أكثر من كويندية على الحامل الكويندي بشكل وتركيب الستيرجماتا ، ترتيب الكويندات ومميزاتها إذا ما كانت الكويندات ملتصقة معها.

د- **مميزات أخرى:** مثل الستولين الرايزود Foot cell أو إذا كانت مكونة جراثيم كلاميدية أو غيرها.

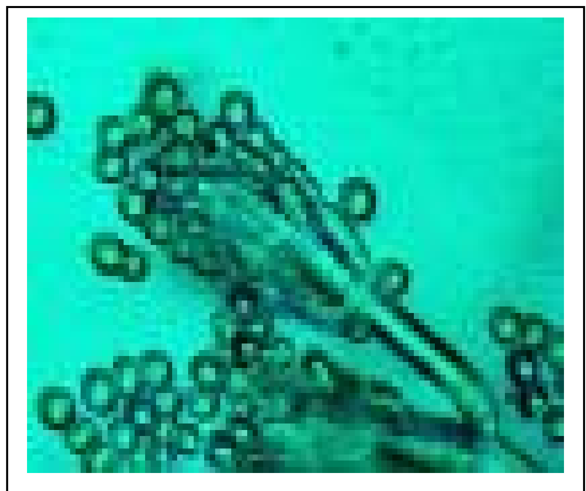
هـ- ارسم عينات من الفطريات وذلك للتعرف على صفاتها(مستعينا بالأشكال4، 5، 6)الموجودة بالصفحة التالية)



شكل(4) الشكل المجهري لفطر Rhizopus *nigrecans*



(شكل(5) الشكل المجهري لفطر *Candida.sp*



شكل(6)الشكل المجهري لفطر *Pen.sp*

التدريب العملي

أمامك البيئات التي قمت بتحضيرها

1- بيئة أجار المولت.

2- بيئة المولاسا الصلبة.

والمطلوب اتباع الخطوات التي ذكرت سابقا ثم دون النتائج في الجدول التالي:

م	نوع المادة المستخدمة في التلقيح	الميسليوم		الجراثيم غير التزاوجية				الأجسام الثمرية		
		مقسم	غير مقسم	اللون	الحجم	الشكل	التركيب	اللون	الشكل	الموضع
1	الجبن									
2	الزبد									
3	شـــــراب طبيعي									
4	مربى									
5	خبز رطب									

أسئلة

س1 : ما هي الفطريات؟ ومم تتركب؟

(1)- -

(2)- -

(3)- -

- -

س2: لماذا يضبط الـ pH لبيئة الفطريات عند5و5 ؟

- -

- -

- -

- -

س3: ارسم عينات من الفطريات التي تحصلت عليها وتعرفت عليها تحت الميكروسكوب وذلك للتعرف على صفاتها.؟

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الخمائر في الأغذية

الجدارة: التعرف على المواصفات الخاصة بالفطريات.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على أشكال الخمائر التي تحصل عليها بعد إجراء الاختبارات الميكروبيولوجية.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل الطالب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الخمائر في الأغذية

الخمائر فطريات تتبع عائلات عديدة وهي تتكاثر بالتبرعم أو بالانقسام الثنائي البسيط أو بالتجرثم في الأنواعاً التابعة للاسكوميسيتس *Ascomycetes* وأهمها ما يتبع جنس *Saccharomyces* ويشمل أنواع عديدة منها *S. Cerevisiae* التي تستعمل في صناعياً في تخمير الخبز أو إنتاج الكحول و الجليسيرول وتوجد أنواع أخرى من الخميرة الكاذبة تسمى False yeast التي منها جنس *Torulopsis*وهي تحدث تخمرات غير مرغوب فيها ولكنها تستعمل صناعيا في بعض الأغراض الطبية كما أن بعضها يستعمل كغذاء.

وعموماً تنمو الخميرة في البيئات السائلة على الصورة الآتية:

1. خميرة غشائية Film forming yeastsتؤكسد الأحماض العضوية والسكريات والكحولات.
2. خميرة سطحية Top yeasts تستعمل في صناعة البيرة المسماة الـ Ale beer.
3. خميرة قاعية Bottom yeasts تستعمل في صناعة البيرة المسماة لاجر Lager beer.

الأدوات والمواد اللازمة:

أ- بيئة خميرة تتحمل التركيزات العالية Osmophilic yeasts(بيون السكريات)

1- يحضر لتر من بيئة المرق المغذى ويضاف إليه السكر المراد اختبار تحلله (الجلوكوز- اللاكتوز- السكروز) بواقع5 جم.

2- يضاف محلول دليل بروم ثيمول الأزرق1مل.

3- تملا الأنابيب ويوضع بكل منها 7 مل مع وضع أنبوبة در هام.

4- التعقيم في جهاز الاوتوكلاف على درجة حرارة121ْ م وتحت ضغط15 رطل/ بوصةالمربعة ولمدة 15ق.

ب- بيئة مرق الجلوكوز المغذى

مثل بيئة بيون السكريات مع إضافة سكر الجلوكوز5جم.

ج- بيئة لبن دوار الشمس: ذكرت سابقا.

د- دليل بروموثيمول الأزرق:

الدليل 16جم، كحول95٪ 500مل، ماء مقطر500 مل، حيث يذاب الدليل في الكحول ثم يضاف الماء والترشيح.

هـ- **بيئة أجار عصير البرتقال المائل: تتكون من:-**

تربتون10جم، مستخلص الخميرة3 جم، جلوكوز4 جم، فوسفات ثنائي الصوديوم3 جم، عصير برتقال200 مل، أجار5و1٪ أجار أجار، ماء مقطر800 مل يحضر عصير البرتقال بتسخين لتر من العصير الطازج إلى93°م تقريبا ثم الترشيح في مرشح بوخنر ثم التعقيم على15 رطل لمدة15 دقيقة.

بالإضافة إلى ما سبق يجب أن تتوفر المواد الآتية:

1- مزرعة من خميرة (حقيقية) مثل الـ *S . cerevisiae*.
2- مزرعة من خميرة (كاذبة) مثل الـ *Torula*
3- بيئة مرق السكروز المغذي بنسبة1, 20, 40, 65 سكروز.
4- عصير الكرنب (اللاهانة).
5- مرق اللاكتوز المغذي.
6- بيئة جرودوكوا Gorodkowa.

طريقة إجراء الاختبار

قم بتحضير البيئات السابق ذكرها ثم استخدامها في إجراء التجارب التالية

1- **خمائر تعيش تحت ضغط أسموزي مرتفع** Osmophilic yeasts

أ) لقح كل من الأنابيب المحتوية على بيئة مرق السكروز بنسبة1٪, 20, 40, 65 بمزرعة من الـ Osmophilic yeasts مثل *Zygosaccharomyces sp* ومجموعة مماثلة من البيئة السابقة بمزرعة خميرة الخباز *S. cerevisiae* .

ب)حضن الأنابيب السابقة في درجة حرارة المعمل لمدة تتراوح من5–7 يوم ثم لاحظ مقدار النمو وذلك بالتغير الظاهر في البيئة وكذلك الغاز المتكون في التركيزات المختلفة.

2- **الخميرة الغشائية** Film yeasts

أ- لقح أنبوبة محتوية على عصير الكرنب Sauer kraut juice (5 مل) بخميرة غشائية وأخرى بخميرة *S. cerevisiae* قدر الرقم الأيدروجيني للعصير قبل ا لتحضين بواسطة pH-meter أو بواسطة ورق الرقم الأيدروجيني.

ب- حضن الأنبوبتين في درجة حرارة المعمل ولمدة7أيام لاحظ شكل النمو ورائحة كل من الأنبوبتين ثم قدر الرقم الأيدروجيني في العصير لكل أنبوبة.

3- **الخمائر المخمرة للسكر** Sugar fermenting yeast

أ- لقح أنبوبة من مرق الجلوكوز وأنبوبة من مرق اللاكتوز وثالثة من بيئة لبن تباع الشمس بنوع من الخميرة الكاذبة التي تخمر اللاكتوز (*Torula*) ثم لقح مجموعة أخرى من البيئات الأخرى بخميرة بيرة التي لا تخمر اللاكتوز.

ب- حضن الأنابيب على درجة حرارة المعمل لمدة2–5 يوم ثم اختبره للآتي:النمو, تكوين الغاز, مقدار التعكير والراسب في بيئة المرق, تكوين الغاز والتغير في الرقم الأيدروجيني في بيئة اللبن, رائحة الأنابيب.

4- **الخميرة الحقيقية**: Ascospore Forming

أ- لقح بيئة أجار عصير البرتقال المائل Orange juice sugar slantأو بيئة جور ودكوا Gorodkowa بنوع *S. cerevisiae* ونوع *Zygosaccharomyces* .

ب- حضن على درجة حرارة25°م ثم اختبر كل أسبوع لمدة تتراوح من2–3 أسابيع للجراثيم الاسكية وللتزاوج ثم دون النتائج المتحصل عليها في جدول.

التدريب العملي

أمامك البيئات التي قمت بتحضيرها وهى:-

1- مزرعة من خميرة (حقيقية) مثل الـ *S . cerevisiae*.
2- مزرعة من خميرة (كاذبة) مثل الـ *Torula* .
3- بيئة مرق السكروز المغذي بنسبة0 ,1 ,20، 40, 65٪ سكروز.
4- عصير الكرنب (اللاهانة).
5- مرق اللاكتوز المغذي.
6- بيئة جرودوكوا Gorodkowa.

والمطلوب اتباع الخطوات التي ذكرت في الدرس العملي، وتدوين النتائج في الجدول التالي:

م	وجه المقارنة	الخمائر الأسموزية	الخمائر الغشائية	الخمائر المخمرة للسكريات	الخمائر الحقيقية
1	النمو				
2	التغير في البيئة				
3	تكوين الغاز				
4	الرائحة				
5	رقم الـ pH				
6	مقدار التغير في البيئة				
7	مقدار التعكير				

أسئلة

س1 : أكمل العبارات التالية:

1- الخمائر هي - - - - - - - - - - - - - - وهى تتكاثر - - - - - - - أو- - - - -
- - - - - - - - - - - أو- - - - - - - - - - - - - - - - .

2- هناك أنواع من الخمائر مفيدة للإنسان مثل - - - - - - - - - - - - - - ومنها أنواع غير مرغوب فيها مثل خميرة - - - - - - - - - - - - - - - .

س2: ضع علامة(✓)أو(X)أمام العبارات التالية:-

1- تحتاج الخمائر رطوبة أقل من الفطريات. (   ).

2- تنمو الخمائر في وسط قاعدي. (   ).

3- الخمائر غير مهمة في صناعة الخبز. (   ).

4- تقوم الخمائر بتحويل المحاليل السكرية إلى كحول تحت الظروف الهوائية. (   ).

5- الخمائر الغشائية تؤكسد الأحماض وتحولها إلى ثاني أكسيد الكربون وماء (   ).

س3: صف ما شاهدته تحت الميكروسكوب؟

- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

بكتريولوجيا المياه

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على شكل البكتريا الموجود في الماء ووصفها وإجراء العد الكلي.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان.

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

بكتيريولوجيا المياه

تقدر صلاحية المياه للشرب بأربع تحاليل هي:

1- **التحاليل الكيماوية:**

تقدر فيها الجوامد الكلية والعسر المائي Hardness كذلك يختبر الماء لأنواع من الكيماويات المضرة للإنسان مثل الرصاص السام وأملاح الزنك.

2- **الاختبارات الفيزيائية:**

ويختبر فيها عما إذا كان بالمياه عكارة واللون والطعم والرائحة

3- **الاختبارات البيولوجية:**

ويفحص فيها عن وجود الطحالب والفطريات والبروتوزوا وديدان النيماتودا, عذراء الحشرات التي تنمو على المياه.

4- **الاختبارات البكتريولوجية:**

وهي مهمة في تحديد مدى صلاحية المياه للشرب ومدى إمكانية وجود الماء ملوثاً.

التقدير الكمي لبكتريا المياه: The quantitative examination of water

الطريقة المتبعة عادة للتقدير الكمي البكتريولوجي المتبع في اختبار المياه لا يعطي سوى جزء من العدد الكلي للبكتريا فيها إذ أن معظم الميكروبات الموجودة في الماء التي لا تنمو على البيئات المعملية وعلى العموم لا يهم البكتريولوجي أن يحصل على العدد الكلي للبكتريا في المياه بقدر اهتمامه بمجموعة بكتريا القولون التي قد تصل إلى المياه عن طريق التلوث بمياه المجاري أو بالمواد البرازية. ولاختبار صلاحية عينة ماء لأغراض الشرب واستخدام المنزلي في المصانع يجري عليها الآتي:

1- عدد البكتريا الكلي في عينة المياه.

2- اختبار تلوث العينة بمياه المجاري.

طريقة أخذ العينة:

تؤخذ عينة المياه في زجاجة معقمة ويجب أن تمثل العينة مصدر المياه المطلوب فحصة بكتريولوجيا مع الاحتراس من تلوث العينة أثناء أخذها أو نقلها. وعند أخذ العينة من ماء الحنفية يلاحظ تعقيم فوهة الحنفية باللهب ثم ترك الحنفية مفتوحة لمدة خمس دقائق قبل أخذ العينة. وتؤخذ العينة من الأنهار والترع

والبحيرات من تحت سطح الماء وذلك بغمر زجاجة العينة مقفولة تحت سطح الماء ثم فتح غطائها تحت سطح الماء. يجب أن يجرى اختبار المياه مباشرة وإذا طال الوقت من أخذ العينة لإجراء الاختيار عن 3 ساعات فيجب أن تحفظ العينة في ثلاجة أو في صندوق خاص معد لتبريد وحفظ العينات.

عد البكتريا الكلي في عينة المياه:

البيئات المطلوبة

بيئة أجار التربتون والجلوكوز ومستخلص الخميرة

1- تتكون هذه البيئة من تربتون5 جم، مستخلص الخميرة 2,5 جم، جلوكوز1 جم، اجار20 جم، ماء مقطر1000مل.

2- تذاب المكونات في الماء ثم تغلى في حمام مائي(حتى يذوب الأجار)، ثم يعوض النقص بالتبخير بإضافة الماء ثم اضبط الـ pH إلى 7، ثم رشح في القطن وفي النهاية عبئ وعقم على 121 °م وتحت ضغط15 رطل/بوصة٢ لمدة15دقيقة.

الأدوات والمواد اللازمة:

- زجاجة عينة معقمة.
- 6 أطباق بتري معقمة.
- 6 أنابيب اختبار تحوي كل منها على 9 مل ماء معقم
- 3 ماصات1 مل معقمة.
- 6 أنابيب من بيئة أجار التربتون والجلوكوز ومستخلص الخميرة.

طريقة العمل:

1- رج عينة المياه جيداً25 مرة.

2- انقل بواسطة ماصة معقمة مقدار1 مل من الماء إلى الأنبوبة المحتوية على9 مل ماء معقم فيصبح التخفيف 10/1

3- اخلط الأنبوبة10/1 جيداً باستعمال ماصة معقمة جديدة ثم انقل بواسطة هذه الماصة1 مل من هذه الأنبوبة إلى أنبوبة أخرى بها9 مل ماء معقم فيكون التخفيف100/1

4- اخلط بماصة معقمة جديدة محتويات الأنبوبة (تخفيف100/1) ثم انقل بواسطتها1 مل إلى طبق بتري. وكرر ذلك في طبق آخر.

5- بنفس الماصة كرر ما سبق في الخطورة 4) من أنبوبة تخفيف1000/1

6- بنفس الماصة كرر ما سبق من عينة الماء الأصلية.

7- اكتب على كل طبق التخفيف.

8- سيح أنابيب الأجار العميق ثم برد إلى50 ْم وصب كلاً منها في أحد أطباق بتري السابقة مع مراعاة شروط التعقيم وأغلق الأطباق جيدا واتركها حتى تتصلب.

9- حضن الأطباق مقلوبة في الحضان على 37 ْم لمدة 48 ساعة ثم عد المجاميع باستعمال صندوق العد على أن يكون الطبق المستخدم في العد محتويا على مجاميع يتراوح عددها بين30- 35.

10- خذ المتوسط الحسابي لكل طبقين من تخفيف واحد ثم اضرب في مقلوب التخفيف فينتج عدد البكتريا الموجود في1 مل من العينة.

اختبار تلوث العينة بمياه المجاري:

يعتبر الماء صالحاً للشرب عادة إذا كان خالياً من ميكروبات القولون بشرط أن يكون خالياً من المواد السامة ومجموعة القولون هي ميكروبات عصوية غير متجرثمة. تحلل سكر اللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز وهذه المجموعة توجد عادة في أمعاء الإنسان والحيوان ذي الدم الحار وعلى ذلك فوجودها في الماء يدل على تلوثه ببراز مثل هذه الحيوانات ونظراً لأن الكشف عن الميكروبات المرضية من الصعوبة بمكان وتحتاج إلى وقت طويل ففي العادة تختبر المياه لوجود مجموعة القولون من عدمه فإذا وجدت هذه المجموعة في المياه فإن ذلك يدل على تلوثها بمياه المجاري واحتمال وجود ميكروبات مرضية وتكون المياه غير صالحة للشرب.

واختبار المياه لهذه البكتريا يجرى في العادة على 3 خطوات:

1- الاختيار الاحتمالي Presumptive test

لاختبار وجود مجموعة القولون يجري ذلك الاختبار بتلقيح بيئة بويون اللاكتوز أو بيئة ماكونكى MacConkey السائلة بعينة المياه المطلوب فحصها فإذا تكون غاز حوالي10٪ أو أكثر من حجم أنبوبة درهام في ظرف24 ساعة فإن هذا الاختبار يكون موجبا أما إذا تكون غاز في هذه البيئة بعد24 ساعة أخرى فإن نتيجة الاختبار يكون مشكوكا فيه وعلى ذلك تجرى الاختبارات الأخرى. أما عدم وجود الغازات بعد 48 ساعة فيؤخذ ذلك دليلاً على أن الماء غير ملوث وصالحٍ للشرب ولا داعي لإجراء أي اختبارات أخرى ولإجراء الاختبار الاحتمالي تتبع الخطوات الآتية:

1. عينة المياه .
2. أنابيب فيها بيئة ماكونكي السائلة وتحتوي على أنابيب در هام.

3. ماصات1سم^{3} معقمة، ماصات10 سم 3 معقمة.

بيئة ماكونكي السائلة MacConkey, s bile salt broth

المكونات:

ملح الصفراء Bile salt5 جم، سكر لاكتوز10 جم، ببتون30 جم، ص كل5 جم، ماء مقطر 1000 سم3.

التحضير:

1. تخلط المكونات مع الماء ثم تسخن في حمام مائي للذوبان.
2. ضبط الـ pH إلى 4و7 وترشح في مرشح بوخنر.
3. إضافة الدليل (بروموكريزول بربل1٪)
4. تعبأ الأنابيب بواقع10 مل في كل أنبوبة مع وضع أنبوبة در هام
5. تعقم في جهاز الأوتوكلاف على121 مْ ولمدة20 دقيقة ولمدة3 أيام متتالية

طريقة العمل:

1- لقح أنبوبة ماكونكي بمقدار1مل من عينة المياه.

2- حضن الأنابيب على درجة37ْم.

3- اختبر الأنابيب لوجود حامض وغاز بعد24 ساعة فإذا لم يتكون غاز حضن لمدة24 ساعة وأخرى ثم دون نتيجة وجود الغاز من عدمه بعد كل مدة24 ساعة و48 ساعة.

4- إذا لم يتكون غاز بعد48 ساعة تعتبر النتيجة سلبية ولا تجرى أي اختبارات أخرى أما إذا تكون الغاز فتجرى الاختبارات التالية.

2- **الاختيار التحقيقي** Confirmatory test

إذا كان الاختبار الاحتمالي سابق الذكر مشكوكاً فيه بمعنى ظهور أي كمية من غاز بعد48 ساعة بعد التحضين فيجب إجراء الاختبار التحقيقي فيستعمل عادة إحدى بيئتين صلبتين في الاختبارالتحقيقي وهما:

1- بيئة Eosine methylene blue يرمز لها EMB.

2- بيئة Endo agar.

و يلاحظ الآتي:

1- مجاميع تظهر على بيئة E.M.B ذات مركز أسود ولمعان معدني مخضر تسمى Brown colony with metallic sheen(تشبه الكوبيا)، وهذه هي مجاميع *E. coli* بينما تظهر مجاميع *A. aerogenes* على هذه البيئة بنية المركز وخالية من اللمعان المعدني.

2- إذا استعملت بيئة الاندو أجار تظهر مجاميع *E. Coli* ذات مركز غامق وتتلون البيئة حولها بلون أحمر غامق وقد يكون أولاً لها لمعان معدني أما مجاميع A. *Aerogenes* فلا يظهر لها المركز الغامق وتكون معتمة وردية اللون.

الأدوات والمواد المستعملة:

1- أطباق بتري تحتوي على بيئة Endo agar & EMB.
2- أنابيب ماكونكي التي أظهرت اختباراً موجباً أو مشكوكاً فيه.
3- مزرعة*E. coli* عمرها24 ساعة في مرق مغذي.
4- مزرعة Aerobacter *aerogenes* عمرها 24 ساعة في مرق مغذي

بيئة الايوسين مثلين بلو: Eosin methlene blue agar

تحضر هذه البيئة بإضافة كمية معلومة من اللاكتوز مع صبغتين الايوسين Eosine والمثيلين بلو إلى الأجار المغذي ثم يصب المخلوط في أطباق بتري فيتوقف لون المجاميع التي تظهر على هذه البيئة على العاملين الآتيين:

1- تفاعل الايوسين(وهي صبغة حامضية) مع المثيلين الأزرق(وهي صبغة قاعدية) لتكون صبغة مركبة ذات خواص حامضية أو متعادلة.

2- تكوين كمية من الأحماض نتيجة لتخمر اللاكتوز من شأنها خفض الرقم الهيدروجين مسببا امتصاص الصبغة المركبة على الخلايا المكونة للمجموعة

ويلاحظ أن الميكروبات التي لا تخمر اللاكتوز غالباً ما تكون شفافة (لا لون لها) إذ أن الصبغة المركبة لا تؤخذ على الخلايا في وسط قلوي وإنما تظهر البيئة في لون أحمر.

بيئة أجار الايوسين والمثيلين الأزرق Eosine methylene blue agar

المكونات:

ببتون10 جم، فوسفات ثنائي البوتاسيوم2 جم،أجار20 جم، ماء1000 مل.

التحضير:

1- اخلط المكونات ثم اغلي حتى الذوبان في حمام مائي مع إضافة الماء لتعويض الفاقد بالتبخير.

2- تعبأ في دوارق بواقع100 مل ثم تعقم على121° م وتحت ضغط 15 رطل/ بوصة ٢ و لمدة 15 ق.

3- عند الاستعمال تسيح البيئة بالدوارق في جهاز الأوتوكلاف ثم يضاف إليها كل من: سكر اللاكتوز1 جم، محلول الايوسين المائي2٪ 2 مل، محلول المثيلين الأزرق المائي5و0٪ 3و1 مل.

4- اخلط المكونات جيدا ثم ضع الدوارق في جهاز الأوتوكلاف لمدة5 دقائق، ثم بردإلى50°م وصب في أطباق بتري المعقمة.

طريقة العمل

1- سيح بيئة EMB وبردها إلى درجة45°م قسم قاع الطبق إلى قسمين بواسطة قلم شمع.

2- لقح قسماً بواسطة مزرعة *E. Coli* والآخر بواسطة مزرعة *A. aerogenes* وفي طبق آخر لقح بالخليط أي بالمزروعة التي أثبتت نتيجة موجبة وذلك بطريقة التخطيط.

3- بعد فترة التحضن اختبر المجاميع ودون النتائج.

بيئة أجار إندو Endo agar

المكونات

ببتون 10 جم، فوسفات ثنائي البوتاسيوم5و3 جم، أجار20 جم، ماء مقطر1000 مل.

التحضير

1- اخلط المكونات ثم اغلي حتى الذوبان في حمام مائي

2- أضف ماء لتعويض التبخير

3- املأ دوارق بواقع100 سم لكل منها

4- عقم في الاوتوكلاف على درجة حرارة121°م وتحت ضغط15 رطل/بوصة مربعة ولمدة 15 ق

5- عند الاستعمال تسيح البيئة بالدوارق في جهاز أر نولد ثم يضاف الآتي لكل دورق(100 مل)، لاكتوز 1 جم، كبريتيت الصوديوم5و2 جم، 1 مل محلول الفوكسين القاعدي في الكحول5٪، ماء مقطر2مل.

6- رج الدورق ثم عقم في أر نولد لمدة5 دقائق.

7- برد إلى50 م° ثم صب في أطباق بتري المعقمة.

3- **الاختبار التكميلي** Completed test

يجرى هذا الاختبار عادة للتأكد أن مجاميع *A. aerogenes, E. coli* التي ظهرت على أطباق EMB في الاختبار السابق تبع مجموعة القولون ويشمل:

1- أن الميكروب المعزول من الاختبار الاحتمالي يستطيع أن يخمر اللاكتوز ثانية.

2- أن المجاميع النامية على البيئتين السابقتين والتي تظهر تحت الميكروسكوب عند فحصها بطريقة جرام خلايا عصوية قصيرة سالبة لصبغة جرام غير متجرثمة فإنها تتبع مجموعة القولون.

الأدوات والمواد اللازمة

1- طبق يحتوي على بيئة E. M. B والتي ظهرت عليه مجاميع حقيقية, وغير حقيقية لمجموعة القولون.

2- بيئة ماكونكي وبها أنبوبة درهام.

3- أجار مغذي سائل.

4- شرائح نظيفة

5- صبغة جرام.

طريقة العمل

1- خذ بواسطة أبره معقمة جزءاً من مجموعة الـ Coli form النامية على بيئة E.M.Bولقح بها أنبوبة ماكونكي وكذلك أنبوبة الأجار المائل.

2- ضع الأنابيب في الحضان على درجة37 °م .3- بعد 24 ساعة اعمل غشاء من الأجار المائل واصبغه بطريقة جرام وافحص الميكروب (خلايا عصوية قصيرة، سالبة لجرام وغير متجرثمة).

4- بعد 48 ساعة اختبر أنابيب ماكونكي لوجود حامض وغاز.

5- يكون الاختبار التكميلي موجبا إذا كانت النتيجة إيجابية بالنسبة للخطوتين السابقتين(3، 4).

التفرقة بين أفراد مجموعة القولون

مجموعة القولون: تشمل 3 تحت مجاميع هي

1- *E. coli*

2- *(intermediate) E. freundii*

3- *A. aerogenes*

وتبين التفرقة على نتائج الاختبارات الآتية:

1- اختبار الإندول

2- اختبار أحمر الميثايل

3- اختبار Voges-proskauer

4- اختبار السترات

يلاحظ الآتي:

01أن كل الميكروبات السابقة في المحتمل تلوثها بالبراز.

02إذا حدث تلوث في المياه من عدة مصادر فمن المحتمل أن يوجد بها *E. coli* ولكن إذا كان التلوث من مصدر واحد خلاف البراز فقد يوجد في المياه الأنواع الأخرى بدون وجود *E. coli*

وفيما يلي هذه الاختبارات:

اختبار الإندول

تستطيع بعض الميكروبات أن تحلل الحامض الأميني Tryptophane مع إنتاج مركبة الأندول وتستعمل هذه الظاهرة في التعرف على بعض الميكروبات.

الأدوات:

1- مزرعة *E. coli* عمرها 24 ساعة في المرق المغذى.

2- مزرعة *A. aerogenes* عمرها 24 ساعة في المرق المغذى.

3- أنابيب تحتوي على مرق التريبتون، الذي يتكون من:-

تربتون5جم، مستخلص الخميرة2,5 جم، جلوكوز1جم، أجار20جم، ماء مقطر1000مل.

كيفية تحضير البيئة

أ- تذاب المكونات في الماء ثم تغلى في حمام مائي (حتى يذوب الاجار)

ب- يعوض النقص بالتبخير بإضافة الماء.

ج- ضبط الـ pH إلى7، ثم رشح في القطن.

د- يعبأ ويعقم على121ْ م وتحت ضغط15 رطل/بوصة مربعة لمدة 15 دقيقة.

4- ورق حامض الاكساليك.

5- دليل ارليك بوم Ehrlich- Bohme وهو يتكون من محلولين:

محلول (أ)

95 مل كحول95٪، 1Paradimethyl amino benzaldhyd جم، حامض الايدروكلوريد مركز20 مل، يذاب الألدهيد في الكحول ثم يضاف الحامض مع التقليب المستمر.

محلول (ب)

محلول مائي مشبع من فوق كبريتات البوتاسيوم. يخلط المحلولان (أ ،ب).

طريقة العمل:

1- لقح3 أنابيب مرق التريبتون بميكروب*E. Coli* ومرة أخرى *A. aerogenes*.

2- خذ أنبوبة من الأنابيب الملقحة بكل من *E. Coli*, *A. aerogenes* وضع لكل منها ورقة حامض الأكساليك التي تثبت في الغطاء القطني.

3- ضع الأنابيب في الحضان على 37ْم لمدة يومين.

4- بعد فترة التحضين اختبر الإندول.

طرق الكشف عن الإندول

1- طريقة حامض الاكساليك:

إذا تكون الإندول فإن ورق حامض الاكساليك يتلون باللون الوردي إذا أن الإندول مادة طيارة. فإذا تكونت بفعل الميكروب فإنه يتحد مع بلورات حامض الاكساليك مكوناً لوناً وردياً ويعتبر هذا الاختبار خاص للإندول.

2- طريقة Ehrlich

خذ أنبوبة لكل من الأنابيب الملقحة بكل من الميكروبين *E. Coli* و*A. Aerogenes* المحضنة على درجة37ْ م وضع في كل منهما 1سم^3 محلول Ehrlich.A و1سم3محلول Ehrlich.B فيتكون لون أحمر وردي في حالة وجود الإندول.

ملحوظة:

قد يجرى اختبار الإندول بوضع بضع نقاط من محلول.Ehrlich A. B على قطعة قطن ماص ثم وضع قطعة القطن داخل الأنبوبة بحيث تعلو على سطح المزرعة بمقدار3- 4 سم ثم توضع الأنبوبة في ماء يغلي لمدة15دقيقة فوجودالإندول بالمزرعة يكون لوناً أحمر وردياً على قطعة القطن إذ أنه يتطاير ويتفاعل مع الدليل ويجب عند إجراء الاختبار استعمال بيئة خالية من الكربوهيدرات وإلا فلا يمكن الاعتماد على النتائج.

3- اختبار أحمر الميثيل

يعتبر اختبار أحمر الميثايل كدليل على كمية الحامض المتكونة بواسطة أفراد مجموعة الـ Coli formفعند تخمر كمية معلومة من الكربوهيدرات فإن *E. Coli* تنتج كمية من الحامض أكثر من *A. aerogenes* وعلى ذلك يستعمل هذا الاختبار للتمييز بينهما فالأولى تنتج كمية من الحامض كافية لتغير لون دليل أحمر الميثايل إلى اللون الأحمر بينما الثانية تنتج من الحامض ما يكفي لتغير لون الدليل فيظل لونه أصفر.

الأدوات والمواد المستعملة

1- مزرعة *E.coli* في بيئة المرق المغذى وعمرها24 ساعة.

2- مزرعة *A. aerogenes* في بيئة المرق المغذى وعمرها24 ساعة.

3- أنابيب بويون الجلوكوز(مرق الجلوكوز المغذى).

4- دليل احمر الميثيل.

كيفية تحضير البيئة: تم ذكرها سابقا.

طريقة العمل

1- لقح أنبوبة من بيئة الجلوكوز بميكروب *E.coli والأنبوبة* الأخرى بميكروب *A. aerogenes* واترك أنبوبة بدوت تلقيح.

2- ضع الأنابيب في الحضان على درجة حرارة 37°م لمدة 2- 5 يوم

3- أضف 5 نقاط من دليل أحمر الميثيل إلى كل أنبوبة ثم امزج جيدا.

النتيجة:

وجود لون أحمر يدل على أن الاختبار موجب بينما اللون الأصفر يدل على أن الاختبار سالب.

4- **اختبار الـ** Voges-proskauer test

ينشأ من عملية التحويل الغذائي لبعض المركبات تكوين مواد الغرض منها معادلة الأحماض الناتجة حتى يتفادى الميكروب الوسط الحامضي مثل استيايل ميثايل كاربينول وتعتبر هذه العملية عملية تعادل Neutralization mechanism ويمكن الكشف عن هذا المركب باختبار V. P.

ويستخدم هذا الاختبار للتمييز بين *E.aerogenes,E. coli* لأن الثانية تكون استيايل ميثيل كاربينول بينما الأولى لا تكونه ويعتبر هذا الاختبار عكس الاختبار السابق والاستيايل ميثايل كاربينول بوجود الصودا الكاوية والهواء الجوي يتأكسد إلى Diacetyl الذي يعطي Alphanaphthol والحامض الأميني الأرجنين الموجود بالببتون (الموجود بالبيئة) اللون الأحمر.

الأدوات والمواد المستعملة

1- مزرعة *E. coli* في بيئة المرق المغذى وعمرها24 ساعة
2- مزرعة *A. aerogenes* في بيئة المرق المغذى وعمرها24 ساعة.
3- أنابيب مرق الجلوكوز والفوسفات والببتون.
4- محلول الألفانفثول أو مسحوق الكرياتين.
5- محلول ص أ يد أو بوأ يد40٪.

كيفية تحضير البيئة

ببتون5 جم، بو $_2$يد فوأ$_4$ 5جم، جلوكوز5جم، ماء مقطر1000 سم3.

تخلط المكونات ثم تغلى في حمام مائي. ترشح بواسطة قمع بوخنر وتعبأ ثم تعقم لمدة20 دقيقة ولمدة ثلاث أيام متتالية.

محلول الألفانفثول: الفانفثول5 جم، كحول95 ٪ ويكمل إلى100 سم3.

طريقة العمل

1- لقح أنبوبة مرق الجلوكوز والفوسفات والببتون من مزرعة *E.coli* وأخرى من مزرعة *A. aerogenes* والأخرى بدون تلقيح للمقارنة.

2- حضن الأنابيب على37°م لمدة 48 ساعة.

3- بعد التحضين أضف1 سم3 من ص أ يد وبضع نقط من الألفانفثول أو مسحوق الكرياتين ثم امزج واترك الأنابيب2- 4 ساعة ثم اقرأ النتيجة.

النتيجة: يتكون لون أحمر على السطح في حالة ما إذا كان الاختبار موجبا.

5- اختبار تمثيل السترات

يستطيع *A. aerogenes*وبعض (intermediate) أن يستخدم سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون في بيئة مكونة من أملاح معدنية ولكن *E. coli* لا تستطيع. وعندما تكون النتيجة موجبة فيدل ذلك على أن الميكروبات هي *A. aerogenes* وعدم مقدرة *E. coli* على النمو في بيئة السترات ويستخدم هذا الاختبار للتفرقة بينها ويسمى هذا الاختبار باختبار كوزر.

الأدوات والمواد المستعملة

1- مزرعة *E. coli* في بيئة المرق المغذى وعمرها 24 ساعة.

2- مزرعة *A. aerogenes* في بيئة المرق المغذى وعمرها24 ساعة.

3- أنابيب تحتوي على بيئة السترات.

كيفية تحضير البيئة:

فوسفات الأمونيوم والصوديوم1,5 جم- فوسفات بوتاسيوم أحادى الأيدروجين1جم - كبريتات مغنسيوم مائية0,2 جم- سترات الصوديوم3جم ،ماء مقطر1000 سم3 .تخلط المكونات بالماء ثم تعبأ في أنابيب اختبار وتعقم على 15 رطل لمدة15 دقيقة.

طريقة العمل

1- لقح أنبوبة من بيئة السترات من مزرعة *E. coli* وأخرى من مزرعة *A. aerogenes* والثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

2- حضن الأنابيب على37°م لمدة4أيام

3- بعد فترة التحضين نشاهد النمو من عدمه.

التدريب العملي

أمامك عينة من الماء والمطلوب إجراء الاختبارات عليها للتأكد من نقاوتها وصلاحيتها للاستهلاك الآدمي.

1- قم بتحضير البيئات اللازمة للاختبار(ذكرت سابقا).:

2- قم باتباع الخطوات المذكورة في الدرس العملي.

اولاً :اختبار تلوث العينة بمياه المجاري

م	حالة البيئة	الاختبار الاحتمالي	الاختبار التحقيقي	الاختبار التكميلي
1	تكون غاز			
2	لا يتكون غاز			

3- قم بإجراء مقارنة بين *E.Coli* ، *A. aerogenes*،دون النتائج التي تحصلت عليها من الاختبار بوضع علامة (=) إذا كان الاختبار سلبياً ،علامة (+) إذا كان الاختبار موجباً.

م	اختبار	*E .coli*	*A. aerogenes*
1	الأندول		
2	أحمر المثيل		
3	اختبار فوكس– بروسكوير .V.P))		
4	السترات		

أسئلة

س1: ضع علامة(✓)أو(X) أمام العبارات التالية:-

1- وجود بكتريا القولون دليل على وجود بكتريا ممرضة. ( ).

2- من ضمن الاختبارات الفيزيائية التي تجرى على المياه تقدير اللون والطعم والرائحة. ( ).

3- يجرى الاختبار التحقيقي في حالة الشك في احتمال التلوث. ( ).

4- من الاختبارات التي تجرى للتفرقة بين مجموعة القولون اختبار الاندول. ( ).

5- من التحاليل الكيماوي للمياه الكشف عن العسر. ( ).

س2:أكمل العبارات التالية:-

1- الاختبارات البكتريولوجية تحدد - - - - - - - - - - - - - - - - - - للمياه.

2- تضم بكتريا القولون أنواع- - - - - - - - - - - - ، - - - - - - - - - - - .

3- يعتبر الماء صالحا للشرب إذا كان خاليا من - - - - - - - - - - - ، - - - - - - - - .

4- وجود غازات في أنبوبة درهام دليل على - .

5- الميكروبات التي لا تخمر اللاكتوز غالبا ما تكون- - - - - - - - - - - - - - - - .

6- اختبار تمثيل السترات يعتبر دليلاً على وجود ميكروبات - - - - - - - - - - - - - .

س3: وضح كيف يمكن التفرقة بين أنواع بكتريا القولون؟

- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الإنزيمات البكتيرية

اسم الوحدة: الإنزيمات البكتيرية.

الجدارة: التعرف والكشف عن الإنزيمات التي تنتجها البكتريا.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على نواتج التحلل الإنزيمي الناتج عن فعل البكتريا ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الإنزيمات البكتيرية

تفرز البكتريا عند نموها في بيئة إنزيمات خاصة تقوم بتحليل محتوياتها لكي يسهل امتصاصها وتمثيلها. ونتيجة لعملية التمثيل تتكون مواد ثانوية بالبيئة. ويوجد نوعان من الأنزيمات وهما:

1- إنزيمات خارجية ويفرزها الميكروب خارج الخلية.

2- وإنزيمات داخلية توجد داخل الخلية وعند موتها وتحللها تخرج هذه الأنزيمات إلى الخارج تختلف البكتريا كثيرا في مقدرتها على إفراز الأنزيمات ويعتبر ذلك من أهم الوسائل للتعرف عليها.

تحليل النشا

النشا مادة كربوهيدراتية مكونة من تجمع الجلوكوز Polymer ومصدره النباتات وهو غير قابل للذوبان في الماء وعلى ذلك فهو ليس في متناول البكتريا.ولبعض الميكروبات القدرة على تحليل النشا وذلك بإفرازها إنزيماً خارجياً يعرف بالاميليز (دياستيز) الذي يحلل جزيء النشا الغروي إلى مالتوز ويستطيع المالتوز أن يدخل خلايا البكتريا حيث يتحلل بفعل أنزيم داخلي مالتيز Maltase.

تقسم الميكروبات من حيث تحليلها للنشا إلى قسمين قسم قادر على تحليل النشا وآخر غير قادر على هذا التحليل وتعتبر هذه الخاصية هامة في التعرف على الميكروبات.

وفيما يلي طريقة إجراء الاختبار:

الأدوات والمواد اللازمة

01أنابيب أجار النشا العميق.

02أطباق بتري معقمة.

03مزرعة *E. coli*.

04مزرعة *B. subtilis*.

05محلول اليود.

طريقة العمل

1- سيح أجار النشا ثم برد إلى50 ْم وصب كل أنبوبة في طبق بتري واترك الأجار ليجمد في الأطباق.

2- لقح أحد الأطباق بعمس إبرة التلقيح من مزرعة *E. coli* في وسط الطبق.

3- كرر ما سبق في (2) باستعمال ميكروب *B. subtilis*.

4- حضن الأطباق لمدة48 ساعة على درجة37° م.

5- بعد فترة التحضين اغمر كل طبق بمحلول اليود.

يلاحظ تكون هالة عديمة اللون حول مجموعة الميكروب المحلل للنشا.وقد تظهر بلون أزرق أولا تظهر هذه الهالة في حالة الميكروب غير المحلل للنشا.

تحليل الجيلاتين

الجيلاتين مادة بروتينية تحضر من تحليل مادة بروتينية غير قابلة للذوبان تسمى Collagen والجيلاتين إذا أذيب في الماء فإنه يكون محلولاً غروياً صلباً, وحيث إن الجيلاتين مادة بروتينية فإن كثيراً من الميكروبات تحلله فيفقد بذلك قدرته على التصلب ويصبح سائلاً والأنزيم الذي يحلل الجيلاتين يسمى الجيلاتينيز Gelatinase وهو أنزيم خارجي

تجدر الإشارة إلى أن بيئة الجيلاتين المغذى لها خاصية التصلب Hydrogel على درجة أقل من 25°م ويتحول إلىHydrosol الحالة السائلة على درجة الحرارة أعلى من25°م ويجب أن لا تحتوي البيئة على مادة كربوهيدراتية سهلة التبخر إذ أن الأنزيم المحلل للجيلاتين لا يفرز في وجودها عادة.

يعتبر اختبار تحليل الجيلاتين من الاختبارات الهامة في التعرف على الميكروبات وتعتبر الميكروبات المحللة للجيلاتين ميكروبات محللة للبروتينات Proteolytic وفيما يلي طريقة إجراء الاختبار:

الأدوات و المواد اللازمة

1- مزرعة *B. subtilis or Proteus vulguris*

2- مزرعة *E. coli*

3- خمسة أنابيب جيلا تين مغذي عميق.

طريقة العمل

1- لقح2أنبوبة من بيئة الجيلاتين المغذى العميق بطريقة الوخز من مزرعة*B. subtitles or Proteus sp.*

2- لقح بالوخز أيضاً أنبوبتين من الجيلاتين من مزرعة*E. coli*.

3- اترك الأنبوبة الخامسة بدون تلقيح للمقارنة

4- حضن الأنابيب على درجة37°م لمدة 48 ساعة

5- بعد فترة التحضين انقل الأنابيب إلى ثلاجة أو ضعها في كأس به ماء مثلج لمدة نصف ساعة ثم دون ما تشاهده

النتيجة

إذا تجمد الجيلاتين فإن ذلك يدل على قدرة الميكروبات على تحلله ولكن إذا أسيل الجيلاتين فإن ذلك يدل على تحلله.

ملحوظة

قد يجرى الاختبار السابق باستعمال بيئة الأجار المغذي المحتوي على 10٪ من بيئة الجيلاتين المغذي. فيسيح الأجار ويبرد إلى50°م ثم يصب في الأطباق. تلقح الأطباق بطريقة التخطيط بالميكروبات المراد اختيارها لهذه الخاصية وبعد فترة التحضين تغمر الأطباق بمحلول مكون من15جم $HgCl_2$ و 20جرام HCl مركز,100 مل ماء.

فالميكروب المحلل للجيلاتين تظهر حوله هالة رائقة بينما باقي البيئة تكون ذات لون معتم، ولا تتكون هذه الهالة الرائقة حول الميكروبات غير المحللة للجيلاتين.

التدريب العملي

أمامك البيئات التي تم تحضيرها لإجراء الاختبار للكشف عن مدى حدوث تحلل لكل من:

1- تحلل النشا.

2- تحلل الجيلاتين.

دون نتائج الاختبار في جدول.

م	مظاهر التغير في البيئة	تحلل النشا	تحلل الجيلاتين
1	تكون هالة حول الميكروب		
2	لون الهالة		
3	تجمد الجيلاتين من عدمه		

أسئلة

س1 :أكمل العبارات التالية :-

1- الإنزيمات نوعان - - - - - - - - - - - ، - - - - - - - - - - - - - - - - - .

2- الإنزيم المسئول عن تحليل النشا هو - .

3- تتكون هالة عديمة اللون في حالة وجود مجموعة الميكروبات- - - - - - - - - - - - - -

4- الجيلاتين عبارة عن- -

5- تعتبر الميكروبات المحللة للجيلاتين ميكروبات- - - - - - - - - - - - - - - - - .

س2: تقسم الميكروبات من حيث تحليلها للنشا إلى:-

1- -
- -

2- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

إنزيمات التحلل المائي

8

اسم الوحدة: تابع إنزيمات التحلل المائي.

الجدارة: التعرف والكشف عن الإنزيمات التي تنتجها البكتريا.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على نواتج التحلل الإنزيمي الناتج عن فعل البكتريا ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان.

الوسائل المساعدة

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

تابع - الإنزيمات البكتيرية

تحليل الكازين

الكازين عبارة عن فوسفوبروتين وهو الجزء البروتيني الرئيس في اللبن، تستطيع بعض الميكروبات أن تحلل الكازين إلى مشتقات قابلة للذوبان ويعرف ذلك باسم الـPatronization .

والأنزيم الذي يحلل الكازين يسمى كازياز Casease وهو أنزيم خارجي ويمكن إثبات وجود هذا الأنزيم بتلقيح الميكروب بطريقة التخطيط على سطح بيئة أجار اللبن فإذا تكونت هالة رائقة حول النمو البكتيري فإن ذلك يدل على إفراز الأنزيم. تستطيع بعض الميكروبات إفراز أنزيم الكازياز والبعض الآخر لا يستطيع ذلك ويعتبر هذا الاختبار هام في التعرف على الميكروبات

الأدوات والمواد اللازمة

1- لبن فرز معقم
2- أنابيب أجار مغذي عميق
3- أطباق بتري معقمة
4- مزرعة *E. coli*.
5- مزرعة *B. subtitles*.
6- مزرعة *Streptococcus lactis*

طريقة العمل

1- سيح ثلاث أنابيب أجار عميق ثم بردها إلى درجة50ْ م.
2- ضع1سم^3 من اللبن الفرز المعقم بواسطة ماصة معقمة في كل ثلاثة أطباق بترية ثم صب الأجار المغذي وحرك الطبق لكي ينتشر اللبن في الأجار وبانتظام ثم اترك البيئة لتجمد.
3- لقح بالتخطيط كل طبق بأحد الميكروبات الثلاثة.
4- اقلب الأطباق وحضن على درجة37ْم لمدة3- 4 أيام.
5- اختبر الأطباق لوجود هالة رائقة حول المجاميع ثم اغمر الأطباق بمحلول10٪ HCl فإذا ظلت الهالة الرائقة موجودة فإن ذلك يدل على أن الميكروب يحلل الكازين. أما إذا كانت الهالة الرائقة موجودة ثم اختفت بعد إضافة الحامض أو لم تكن موجودة أصلاً فإن ذلك يدل على أن الميكروب غير محلل للكازين

6- لاحظ أيضاً رائحة الأطباق خصوصاً التي بها تحلل للكازين حيث تظهر رائحة غير مرغوبة

تحليل الدهون

لبعض الميكروبات القدرة على تحليل الدهون وينتج عن ذلك تزنخها أو فسادها. وينتج عن التحليل الجليسريدات ذات الوزن الجزئي المنخفض جليسرين وأحماض دهنية طيارة أما الجليسريدات العالية فتتحلل إلى جليسرول وأحماض دهنية.

الأدوات والمواد اللازمة

1- أطباق بتري معقمة.
2- ماصات معقمة.
3- أنابيب أجار مغذي عميق.
4- محلول كبريتات النحاس.
5- مزرعة *Pseudomonas flourescens*.
6- مزرعة *E.coli*
7- مزرعة *B.subtilis*.
8- مزرعة *Pencillium*.
9 –زيت بذرة القطن المعقم أو زبدة معقمة

طريقة العمل

1- سيح أنابيب الأجار العميق ثم برد إلى50ْم
2- انقل بماصة معقمة مقدار1سم^3 من الزيت أو الزبد المعقم السايح إلى أنبوبة للأجار ثم رج جيداً حتى يتكون مستحلب ثم صب الأجار في طبق بتري معقم واتركه حتى يتجمد.
3- قسم قاع الطبق إلى أربعة أقسام باستعمال قلم شمع ثم لقح كل قسم بأحد الميكروبات الموجودة أمامك
4- حضن الطبق على درجة37ْم لمدة3- 4 أيام.
5- بعد فترة التحضين أغمر الطبق بمحلول كبريتات النحاس. لاحظ ما تشاهده.

النتيجة

يشاهد لون أخضر مزرق حول وتحت المجاميع المحللة للدهون وذلك نتيجة لاتحاد الأحماض الدهنية الناتجة عن تحلل الدهن مع كبريتات النحاس

التدريب العملي

أمامك البيئات التي تم تحضيرها لإجراء الاختبار للكشف عن مدى حدوث تحلل لكل من:

1- تحلل الكازين.

2- تحلل الدهون.

دون نتائج الاختبار في جدول.

م	مظاهر التغير في البيئة	تحلل الكازين	تحلل الدهون
1	تكون هالة حول الميكروب		
2	لون الهالة		
3	تكون رائحة		

أسئلة

س1 : أكمل العبارات التالية:

1- الكازين عبارة عن- .

2- الإنزيم المحلل للكازين هو- .

3- يتعرف على وجود إفراز للإنزيم بتكون- - - - - - - - - - - - - - - - - - .

4- ينتج عن تحلل الدهون- - - - - - - - - - - - - - ، - - - - - - - - - .

5- يتعرف على تحلل الدهون بتكون لون- - - - - - - - - حول المجاميع المحللة للدهون.

س2: ما هو تفسيرك للنتائج التي تحصلت عليها في الجدول؟

- -
- -
- -
- -
- -

الاختبار البكتريولوجي للفواكة

اسم الوحدة: الاختبار البكتريولوجي للفواكه المجففة.

الجدارة: التعرف والكشف عن الميكروبات التي توجد في الفواكه المجففة.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على نواتج التحلل الإنزيمي الناتج عن فعل البكتريا ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان.

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الاختبار البكتريولوجي للفواكه المجففة

تحتوي الفاكهة المجففة في العادة على أعداد مختلفة من الفطريات والخمائر والبكتريا ولكنها غير نشطة نظراً لارتفاع نسبة السكر في هذه الفواكه ولعدم وجود الرطوبة الكافية.

الأدوات اللازمة

1- فواكه مجففة (تين– بلح– مشمش– زبيب).
2- سكين وملقط معقم.
3- أطباق بتري معقمة.
4- ماصات معقمة.
5- بيئة أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة.
6- بيئة مرق اللاكتوز المحتوية على دليل بروموكريزول بريل
7- بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة.
8- بيئة أجار المولت.

طريقة العمل

أ- تقدر عدد البكتريا بطريقة الأطباق:

2- أوزن مقدار 10جم من الفاكهة المجففة تحت ظروف التعقيم ثم انقلها إلى 90سم^3 ماء معقم، اتركها لمدة 10 - 15 دقيقة ثم رج بشدة.

3- اعمل تخفيفات مناسبة1/10 ، 1/100 ، 1/1000، 1/10000

4- خذ1سم^3 من التخفيفات السابقة وضع كلاً منها في طبق بتري معقم ثم صب عليه بيئة أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة.

5- حضن الأطباق على درجة حرارة المعمل لمدة 5 أيام ثم عد البكتريا شاهد أنواع البكتريا الموجودة على الأطباق مع فحصها ميكروسكوبيا. بعد صبغها بصبغة جرام.

ب- اختبار وجود الخمائر Detection of yeasts

ضع قطعة من الفاكهة المجففة في أنبوبة محتوية على بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة المحمضة بحامض اللاكتيك إلى رقم 4pH ثم حضن الأنبوبة على درجة حرارة المعمل لمدة5 أيام ثم اختبر ميكروسكوبيا للخميرة أو للبكتريا الموجودة

ج- اختبار وجود الميكروبات التي تخمر اللاكتوز:

ضع قطعة من الفاكهة المجففة في أنبوبة محتوية على بيئة مرق اللاكتوز ودليل بروموكريزول بريل والتي بها أنبوبة در هام حضن على درجة37°م لمدة2يوم ثم اختبر لوجود غاز في أنبوبة درهام وتكوين حامض بالبيئة افحص ميكروسكوبيا.

د- اختبار وجود الفطريات Detection of molds

ضع 1سم^3 من تخفيفات{1/1،1/10/100، 1/1000} كلاً في طبق بتري معقم ثم صب عليها بيئة أجار المولت رقم pH لها3.5 حضن على درجة حرارة الحجرة لمدة 5 أيام قدر عدد الفطريات وكذلك لاحظ الأنواع الموجودة

التدريب العملي

أمامك عينات من الفواكة المجففة (زبيب- بلح- مشمش). والمطلوب فحص هذه العينات وإجراء كل من الاختبارات التالية:

1- تقدير العدد الكلي للبكتريا بطريقة العد بالأطباق.

2- اختبار وجود الخمائر.

3- اختبار وجود الميكروبات المخمرة لسكر اللاكتوز.

4- اختبار وجود الفطريات.

5- دون نتائج الاختبار في جدول.

م	نوع التغير في البيئة	اختبار وجود الخمائر	اختبار وجود الميكروبات المخمرة للاكتوز	اختبار وجود الفطريات
1	تكون غاز			
2	الفحص الميكروسكوبي			
3	الصبغ بجرام			

أسئلة

س1 : ما هي أنواع الأحياء الدقيقة التي تتوقعها أن تتواجد على الفاكهة المجففة؟(تين- مشمش).

س2: لماذا يكون العفن أكثر سببا في تلف الفاكهة ؟

س3: نتيجة الفحص الذي قمت به- اذكر أنواع الأحياء الدقيقة التي وجدتها على الفاكهة المجففة؟ مع رسم هذه الأحياء الدقيقة ؟

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الاختبار البكتريولوجي للدقيق

الاختبار البكتريولوجي للدقيق

10

الجدارة: التعرف والكشف عن الميكروبات التي توجد في الدقيق.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على الميكروبات التي تتواجد في الدقيق ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان الكهربائي- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

اختبار الدقيق بكتريولوجيا

عدد الميكروبات بالدقيق

يحتوي الدقيق على أنواع عديدة من الميكروبات كالفطريات والخمائر والبكتريا والاكتينوميسس وتتوقف كميتها على عوامل عديدة منها درجة الرطوبة ونظافة البذور المطحونة من الأمراض النباتية الفطرية والبكترية وتلوث الدقيق بالأتربة.

وعادة توجد البكتريا المتجرثمة بأعداد وفيرة نسبياً وذلك في طور الجراثيم لعدم ملاءمة الدقيق لنمو الأطوار الخضرية إذا ما كانت نسبة الرطوبة به قليلة.

الأدوات والمواد اللازمة

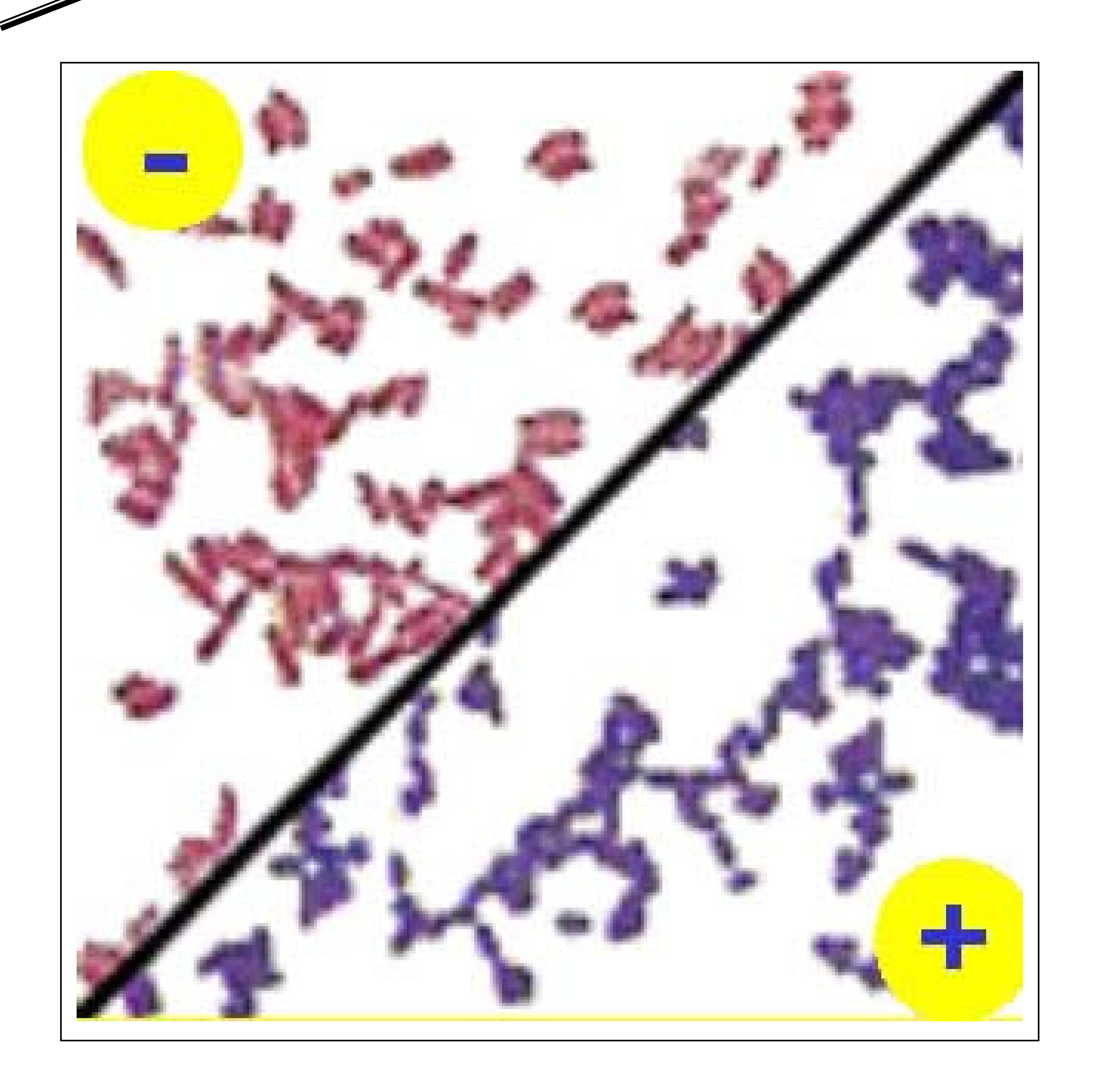
1- أطباق بتري معقمة.
2- ماصات معقمة.
3- أنابيب اختبار بها 9سم3 ماء معقمة.
4- بيئة الأجار المغذي.

طريقة العمل

1- أوزن مقدار10جم من الدقيق الجاف بدقة ثم انقلها إلى زجاجة تحتوي90سم^3 ماء معقم.
2- رج جيداً ثم أجر التخفيفات إلى10000/1.
3- خذ من كل تخفيف1سم^3 في طبق بتري معقم ثم صب عليه بيئة الأجار المغذي بعد تسييحه وتبريده إلى درجة45ْم
4- حضن الأطباق على درجة30ْم لمدة يومين
5- عد الميكروبات النامية على الأطباق ثم قدر العدد الكلي في الجرام الواحد وزن جاف.
6- قسم الميكروبات النامية إلى بكتريا وخميرة وفطريات ثم قسم البكتريا إلى مجاميع بكتريا متجرثمة – ملونة..الخ.

تقدير عدد الجراثيم البكتيرية

يمكن تقدير عدد البكتريا المتجرثمة وذلك بتسخين التخفيفات السابقة على درجة80ْم لمدة15 دقيقة ثم زرعها كما سبق وعدها بعد فترة التحضين، قدر عدد البكتريا المتجرثمة في عينة الدقيق التي أمامك ثم انسبها إلى العدد الكلي للبكتريا.



شكل(6) الشكل المجهري البكتريا(-) سالبة لجرام، (+) موجبة لجرام

التدريب العملي

أمامك البيئة التي قمت بتحضيرها وهى بيئة الأجار المغذي. والمطلوب إجراء الاختبار مع اتباع الخطوات كما ذكرت في الدرس العملي

م	نوع العينة	العدد الكلي للميكروبات	عدد الجراثيم البكتيرية
1	دقيق		
2	القشور الخارجية(النخالة)		

أسئلة

س1 : ما هي أنواع الأحياء الدقيقة التي تعيش على الحبوب ؟

- -
- -
- -
- .

س2 :ما هو تأثير عملية الطحن على عدد الأحياء الدقيقة في الطحين؟

- -
- -
- .

س3 :لماذا تكثر الأحياء الدقيقة على الطحين الذي يحتوي على نسبة من القشور(النخالة) عن الطحين الأبيض النقي؟

- -
- -
- -

- -

- -

س4: لماذا ينمو العفن على قطعة الخبز الرطبة؟

- -

- -

- -

س5: صف الأحياء الدقيقة التي حصلت عليها نتيجة الاختبار العملي الذي قمت به؟

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الاختبار البكتريولوجي للمشروبات المعبأة

الجدارة: التعرف والكشف عن الميكروبات التي توجد في المشروبات المعبأة.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على الميكروبات التي تتواجد في المشروبات المعبأة ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الاختبار البكتريولوجي للمشروبات المعبأ ة

يجب أن تكون المشروبات المعبأة نظيفة بكتريولوجياً ويطبق عادة على هذه المشروبات المواصفات البكيريولوجية الخاصة بمياه الشرب.

الأدوات اللازمة

1. مشروبات معبأة في زجاجات ومكوناتها الغذائية
2. أطباق بتري معقمة.
3. بيئة أجار المولت.
4. بيئة ماكونكي السائلة.
5. بيئة الأجار المغذي.
6. زجاجات معدة للتعبئة.
7. ماصات معقمة.
8. سدادات لهذه الزجاجات

(أ) اختبار المشروبات الجاهزة للاستهلاك

1- **الحصول على العينة**

افتح زجاجة تحت شروط تعقيم و عقم فوهة الزجاجة بتعريضها للهب، ثم اسحب عينة باستعمال ماصة10سم^3 معقمة, (العينات المحتوية على غاز ثاني أكسيد الكربون يجب أن تفتح قبل أخذ العينة بساعة أو ساعتين وذلك للتخلص من الغاز. ويجب التأكد من أن الكمية المأخوذة من العينة للتحليل كلها سائل وليس بها غاز)

2- **العد بطريقة الأطباق**

خذ 1سم^3 من العينة وقدر عدد البكتريا باستعمال الأجار المغذي وعدد الفطريات والخمائر باستعمال أجار المولت حضن على درجة 30°م لمدة3 يوم ثم احسب العدد في1سم^3

3- **فحص العينة لميكروبات القولون**

لقح1سم^3 من العينة في أنبوبة تحتوي على بيئة ماكونكي السائلة المزودة بأنبوبة درهام مع عمل5 مكررات، حضن على درجة37°م لمدة3 أيام واختبر وجود الغاز.

ملحوظة

يطبق عادة على هذه المشروبات المواصفات البكتريولوجية الخاصة بمياه الشرب

(ب) فحص المكونات الغذائية المصنوع منها المشروبات

1- **تحضير العينة**

أ) السكر: أوزن10جم من السكر وضعها في زجاجة تحتوي90سم^3 ماء معقم، خذ5سم3, 1سم^3 في طبق بتري معقم وصب عليه البيئة(سيأتي ذكرها في2)

ب) الشراب خذ10سم3 من الشراب واضفه إلى90سم^3 ماء معقم قدر من هذا التخفيف عدد الميكروبات في 1سم^3 منه (مثل السكر).

ج) المادة المكسبة للطعم واللون قدر عدد الميكروبات في1سم^3 وفي تخفيف10/1 من المادة المطلوب فحصها

2- **العد بطريقة الأطباق**

تستعمل بيئة الأجار المغذي لتقدير العدد الكلي وبيئة أجار المولت لتقدير عدد الفطريات والخمائر، قدر الميكروبات في جرام واحد من السكر أو الشراب أو1سم^3 من المادة المكسبة للطعم أو اللون.

ج- الاختبارات البكتريولوجية للزجاجات المعدة للتعبئة

1- أضف10سم^3 من بيئة أجار المولت إلى إحدى الزجاجات ثم لف الزجاجة حول نفسها حتى تلامس البيئة جميع سطحها ثم اتركها على أحد جوانبها وحضنها

2- انقل10سم^3 من ماء معقم+2 جم من الكوارتز المعقم في الزجاجة، رج جيداً بحيث يلامس الماء جميع أسطح الزجاجة

3- قدر عدد الميكروبات فيه بطريقة الأطباق مستعملاً بيئة أجار المولت

يمكن تقدير عدد ميكروبات القولون باستعمال بيئة ماكونكي السائلة المحتوية على أنابيب درهام

اختبار غطاء الزجاجات بكتريولوجياً

خذ غطاء تحت شروط تعقيم ثم عرض السطح الخارجي له للهب ثم ضعه في طبق بتري معقم بحيث السطح الداخلي يكون الخارج، صب أجار المولت، قدر عدد البكتريا والخمائر والفطريات بكل غطاء.

التدريب العملي

أمامك البيئات التي قمت بتحضيرها والمطلوب إجراء الاختبار مع اتباع الخطوات التي ذكرت لك.

م	نوع المشروب	اختبار المشروبات الجاهزة	اختبار المكونات الداخلة في التصنيع	اختبار العبوات
1	شراب طبيعي			
2	عصائر			
3	مياه غازية			

أسئلة

س1 :أكمل العبارات التالية:

1- العينات المحتوية على غاز Co_2 يجب أن تفتح قبل أخذ العينة - - - - - - - - - وذلك من أجل- -

2- يجب التأكد من أن الكمية المأخوذة من العينة للتحليل كلها - - - - - - - - - - - - - - .

3- يطبق عادة على هذه المشروبات المواصفات البكتريولوجية الخاصة - - - - - - - - - - - - - .

4- يجب أن تكون المشروبات المعبأة نظيفة - .

س2: اذكر الاختبارات التي تجرى للتأكد من نقاوة المياه ؟

1- الاختبار الاحتمالي -
- -

- -
- -
- -

2- الاختبار التحقيقي -

- -
- -
- -
- -
- -

3- الاختبار التكميلي -

- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- -
- .

الأحياء الدقيقة في الأغذية

الفحص البكتريولوجي للأغذية المعلبة غير الفاسدة

الجدارة: التعرف والكشف عن الميكروبات التي توجد في الأغذية المعلبة.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على الميكروبات التي تتواجد في الأغذية المعلبة على أن تكون غير فاسدة ووصفها.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان- جهاز العد الكلي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

الفحص البكتريولوجي للأغذية المعلبة غير الفاسدة

تختبر الأغذية المعلبة بكتريولوجيا من حيث تمام جودة التعقيم والقدرة على الحفظ ويجري معرفة جودة التعقيم بأخذ عينة منها مباشرة وفحصها بكتريولوجيا أما قدرتها على الحفظ فيجري هذا الاختبار بتحضين العلب وهي مقفلة فترة من الزمن.

الأدوات اللازمة

1- أغذية معلبة(خضر وفاكهة).
2- بيئة أجار الجلوكوز والتربتون المحتوية على دليل بروموكربزول بريل.
3- بيئة أجار البيتون والحديد.
4- بيئة مرق الكبد.
5- بيئة أجار المولت.
6- أطباق بترية معقمة.

طريقة العمل

1- اختبار الخضروات المعلبة من حيث تمام جودة التعقيم

تحضير العينة

أ- تفتح العلبة تحت شروط التعقيم، وذلك بتعقيم مكان الفتحة باللهب أو بأي وسيلة أخرى وتستخدم فتاحة بعد تعقيمها في اللهب وتفتح بها العلبة في هذا المكان المعقم.

ب- انقل15جم أو15سم^3 من الغذاء، تستعمل ماصة معقمة ذات نهاية متسعة لنقل السوائل، كما يستعمل

ثاقب فلين أو ملعقة spatula معقمة لنقل الأغذية الصلبة أو النصف صلبة يستعمل كذلك قضيب زجاجي معقم للمعاونة في إدخال العينة إلى أنبوبة اختبار معقمة.

إجراء الاختبار:

أ) تخلط المادة الغذائية مع مثل حجمها من الماء المعقم جيداً قبل التلقيح وترج جيداً ويوزع15سم^{3}أو15 جرام منها على3 أنابيب من البيئات استعمل واحدة أو أكثر من البيئات الآتية

1- بيئةأجارأومرق الجلوكوز والتربتون المحتوي على دليل بروموكريزول بريل (لاختبار وجود الميكروبات المحدثة للفساد الحمضي المستتر).
2- بيئة مرق الكبد (لاختبار وجود الميكروبات المحللة للبروتينات) والمحدثة لحالات الانتفاخ بالعلب
3- بيئة أجار البيتون والحديد(لاختبار الميكروبات المسببة للفساد الكبريتي).

ب) حمض مجموعة من3 أنابيب على درجة37ْم وأخرى على55ْم لمدة48- 72 ساعة ثم اختبر للنمو ثم افحص ميكروسكوبيا بعمل غشاء وصبغة بطريقة جرام.

2- اختبار الفواكه المعلبة وغيرها من الأغذية الحامضية لكونها معقمة

يجرى هذا الاختبار بغرض معرفة مدى تعقيم أو وجود البكتريا التي قد تسبب فساد الغذاء الحامضي.

تحضير الاختبار السابق:

إجراء الاختبار

أ- وزع 15سم^3, أو15حجم من العينة على5أطباق بتري معقم ثم صب بيئة أجار ا لمولت, حضن على درجة30ْم لمدة72 ساعة, ثم اجرِ العد لمجاميع الميكروبات المحبة للحموضة النامية ودون النتائج التي تحصل عليها.

ب- وزع15سم^3, أو15 جم في 6 أنابيب من كل من البيئات التالية:-

1- مرق الجلوكوز والتريتون المحتوي على دليل بروموكريزول بريل.

2- مرق الكبد.

ملحوظة:

من الأجار المعقم فوق سطح البيئة السائلة، ثم حضن ثلاثة أنابيب من كل بيئة على درجة37ْم لمدة48- 72 ساعة و3أنابيب أخرى على درجة55ْم لمدة48 ساعة ابحث عن الميكروبات اللاهوائية المحللة للبروتينات.

ملحوظة:

إذا كانت المادة تحتوي على جزء سائل وجزء آخر صلب يؤخذ عينة من السائل كما سبق ومن الصلب باستعمال ملقط معقم ثم يجرى ما سبق في عمل شرحة في(1، 2).

اختبار قوة الحفظ

1- الاختبار الميكروسكوبي:لعلب على درجة37ْم لمدة30 يوم للميكروبات الميزوفيلية وأخرى على 55 ْم لمدة10أيام للميكروبات الثروموفيلية ثم اختبر كالآتي:

أ- الاختبار الظاهري: لعلامات الفساد على العلب (الانتفاخ) قدر الرقم الأيدروجيني بعد فتحها.

ب- الاختبار الميكروسكوبي بتحضير غشاء من العلبة وفحصه ميكروسكوبيا بعد صبغه بطريقة جرام مثلاً

2- الأطعمة الحامضية الأكثر:حضن العلب على درجة30ْم أو على درجة حرارة المعمل لمدة14 يوم إلا إذا كانت العلب قد مكثت مثل هذه المدة بالمعمل بعد تصنيعها, اختبر ظاهرياً كما سبق في (1)

3- للحصول على معلومات أكثر: فيما يختص بالميكروبات الموجودة يمكن تتبع (2) وخطواتها

التدريب العملي

أمامك البيئات التي حضرتها ، والمطلوب إجراء الاختبار مع اتباع الخطوات التي ذكرت لك.

م	العد الكلي للميكروبات	الخضروات المعلبة	الفواكة المعلبة	الأغذية الحامضية
1	البكتريا			
2	الفطريات			
3	الخمائر			

أسئلة

س1 : ضع علامة(✓)أو(X) أمام العبارات التالية:-

1- للكشف عن مدى جودة عملية التعقيم للأغذية المعلبة تؤخذ عينات مخزنة. ( ).

2- للتعرف على كفاءة عملية الحفظ تؤخذ عينات طازجة. ( ).

3- تستخدم بيئة أجارالجلوكوز والتربتون للتعرف على التحلل للبروتينات. ( ).

4- الأطعمة الحامضية المعلبة تحضن لمدة24 ساعة. ( ).

س2. كيف يمكن التأكد من قوة حفظ كل من

1) الخضروات المعلبة -

- -

- -

- -

ب)الأطعمة الحامضية المعلبة -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- -

- .

الأحياء الدقيقة في الأغذية

دراسة مقاومة الجراثيم للحرارة (الخميرة- البكتريا- الفطر)

اسم الوحدة: دراسة مقاومة الجراثيم للحرارة (الخميرة- البكتريا- الفطر).

الجدارة: التعرف والكشف عن جراثيم الميكروبات التي تقاوم الحرارة.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على جراثيم الميكروبات التي تتواجد في الأغذية وتقاوم الحرارة.

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 95٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة: ساعتان

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان- جهاز العد الكلاي.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

دراسة مقاومة جراثيم الخميرة والفطريات والبكتريا للحرارة

من المعروف أن جراثيم البكتريا أشد مقاومة للحرارة من جراثيم الخمائر والفطريات ويرجع ذلك لأن تركيبها عبارة عن بروتين متماسك به نسبة بسيطة من الماء

الأدوات والمواد اللازمة

1- جراثيم من الفطريات.

2- جراثيم خميرة.

3- جراثيم بكتريا. *B. subtilis*

4- بيئة بويون الجلوكوز ومستخلص الخميرة

5- بيئة مرق مغذي.

طريقة العمل

احتياطات خاصة يجب اتخاذها :-

1- يجب عدم لمس جوانب الأنبوبة بالإبرة أثناء التلقيح فإذا لمست يجب تعقيمها بتعريضها للهب قبل ابتداء تجربة المقاومة للحرارة

2- امزج جيداً الميكروب الملقح بالبيئة

3- إذا سخنت الأنابيب في حمام مائي يجب أن يكون الماء في مستوى أعلى من مستوى سطح البيئة

4- نفذ التعليمات بدقة للمدة ودرجة الحرارة المستعملة.

5- بعد فترة التعريض للحرارة برد بسرعة في ماء مثلج

1- **مقاومة جراثيم الخميرة للحرارة.**

أ- لقح7أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة بمقدار1و0سم^3 من معلق خميرة متجرثمة.

ب- سخن6أنابيب من هذه الأنابيب في حمام مائي على درجة60°م وارفع الأنبوبة الأولى بعد دقيقة والثانية بعد 6 دقائق وهكذا بعد8, 10, 12, 15 دقيقة اترك الأنبوبة السابقة بدون تسخين للمقارنة

ج- برد الأنابيب بعد رفعها مباشرة وبسرعة وحضن كل الأنابيب (السابعة أيضاً وهي المستعملة للمقارنة) على درجة حرارة الحجرة لمدة2- 5 يوم.

د- اختبر مقدار النمو بالتعكير, الرواسب, الغاز المتصاعد ، قارن النمو مع الأنبوبة غير المعاملة ثم أوضح ذلك باستعمال علامة(+).

2- مقاومة جراثيم الفطر للحرارة

أ) الحرارة الرطبة:

1- لقح أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة بمقدار0.1سم^3 من معلق جراثيم الفطر *Penicillium* or *Aspergillus* .

2- أجر ما سبق ذكره في الخميرة

ب)الحرارة الجافة:

1- سخن4أنابيب تحتوي على جراثيم الفطر الجافة في حمام مائي على درجة60°م ثم ارفع أنبوبة بعد10 والثانية بعد20 وهكذا بعد30 و60 دقيقة.

2- أضف تحت شروط التعقيم إلى الأنابيب السابقة بعد تعقيم فوهة كل أنبوبة بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة باستعمال ماصة معقمة إلى نصف الأنبوبة، وباستعمال أبرة تلقيح معقمة حرك البيئة وما بها من جراثيم بغرض توزيعها

3- حضن على درجة حرارة الغرفة لمدة2– 5 يوم ثم اختبر لنمو الفطر.

3- مقاومة جراثيم البكتريا للحرارة

1- اختبر مقاومة جراثيم *B. subtilis* على درجة60°م ذلك بتلقيح0.1سم^3 من معلق الجراثيم في بيئة مرق مغذي عادي، هذا المعلق سبق تسخين إجزاء منه على درجة60°م لمدة2 يوم,3 يوم,4 يوم,7 يوم

2- حضن أنابيب المرق الملقح بمعلق *B. subtilis* السابق الذكر على درجة حرارة المعمل لمدة2–5 يوم ثم اختبر النمو الغشائي على سطح البيئة للميكروب.

التدريب العملي

أمامك البيئات التي قمت بتحضيرها ، والمطلوب إجراء الاختبار.

م	البيئات	مقدار التعكير	الرواسب	الغاز المتصاعد
1	بيئة جراثيم البكتريا			
2	بيئة جراثيم الخمائر			
3	بيئة جراثيم الفطريات			
4	بيئة نقية بدون معاملة			

أسئلة

س1 : أكمل العبارات التالية :-

1- جراثيم - - - - - أشد مقاومة للحرارة من جراثيم- - - - - - - - - ويرجع ذلك إلى- .

2- يجب عدم لمس - - - - - - - - - بالإبرة أثناء التلقيح.

3- عند تسخين الأنابيب في حمام مائي يجب أن يكون الماء- - - - - - - - - - - - - - - - .

4- بعد فترة التعرض للحرارة يجب- .

5- يتم تحضين العينات على درجة حرارة- - - - - - - - - - - ولمدة- - - - - - - - - - - - .

س2: ما هي الاحتياطات الخاصة التي يجب اتباعها عند إجراء الاختبار؟

- -
- -
- -
- -
- -
- -

الأحياء الدقيقة في الأغذية

عد بكتريا الحليب بطريقة العد المباشر

اسم الوحدة:عد بكتريا الحليب بطريقة العد المباشر.

الجدارة:التعرف والكشف عن الميكروبات التي توجد في الحليب.

الأهداف:

1- أن يقوم المتدرب بالتعرف على الميكروبات التي تتواجد في الحليب..

2- أن يتعلم المتدرب كيفية إعداد البيئات وتعقيمها.

3- أن يقوم المتدرب باستخدام الميكروسكوب بالطريقة الصحيحة.

مستوى الأداء المطلوب:أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 98٪.

الوقت المتوقع للتدريب على الجدارة:ساعتان.

الوسائل المساعدة:

1- وجود مختبر للأحياء الدقيقة مجهز بجميع الأدوات اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة.

2- وجود بعض الأجهزة المساعدة مثل: المعقم- الحضان- جهاز العد الكلي للبكتريا.

3- استخدام اللوحات التوضيحية المبينة لأشكال الكائنات الحية الدقيقة.

متطلبات الجدارة:

1- أن يكون المتدرب قادرا على تطبيق خطوات التجربة بدقة والتعرف على أنواع الأحياء الدقيقة التي قام بتنميتها.

2- تحتاج الجدارة التدريب مسبقا على كيفية استخدام الأجهزة التي تستخدم في الاختبار.

عد بكتريا الحليب بطريقة العد الميكروسكوبي المباشر

Breeds method

يمكن إحصاء عدد البكتريا في الحليب بطريقة العد الميكروسكوبي المباشر وفي هذه الطريقة يقدر مساحة الحقل الميكروسكوبي ثم يؤخذ حجم معلوم من الحليب (1/100سم^3) وينشر على مساحة معلومة على الشريحة(1سم2) ثم يترك الحليب ليجف ويزال منه الدهن بالزيلول ثم يثبت الغشاء ويصبغ بالميثلين الأزرق يقدر عدد البكتريا في حوالي25حقل ميكروسكوبي ثم يؤخذ المتوسط الحسابي ويضرب في المعامل الميكروسكوبي(microscopic factor) ويلاحظ عد السلاسل والبكتريا المتجمعة clumps كميكروب واحد وبذلك تعطى هذه الطريقة نتيجة مشابهة للعد على الأطباق

الأدوات والمواد اللازمة :

1- عينة حليب.
2- شريحة ميكروميترية
3- ماصة باستير
4- شريحة بريد Breed أو شريحة مرسوم عليها 1سم^2.

طريقة العمل

1- قدر مساحة الحقل الميكروسكوبي باستعمال العدسة الزيتية بالطريقة الآتية:

أ) اضبط الميكروسكوب على شريحة زجاجية بها تدريج ميكروميتري Micrometric scale(شريحة ميكروميترية) باستعمال العدسة الزيتية ثم ضع نقطة من زيت سيدر على الشريحة الميكرومترية ثم اضبط الميكروسكوب وحرك الشريحة الميكروميترية إلى أن يظهر طرف التدريج Scale في أول الحقل الميكروسكوبي ثم حرك ماسورة الميكروسكوب إلى أعلى إلى أن يصير الحقل الميكروسكوبي مساويا إلى 0.16مم(160 ميكرون) ويلاحظ أنه عند رفع الماسورة يتسع الحقل الميكروسكوبي والعكس صحيح .

ب) عد التداريج الموجودة على طول قطر الحقل وهذا العدد يجب أن يكون من14إلى 16 وهذا معناه أن قطر الحقل الميكروسكوبي0.14– 0.16 مم (140–160 ميكرون).

ج) احسب مساحة الحقل الميكروسكوبي في صورة مربعة باستعمال المعادلة الآتية :

المساحة = ط نق 2 $\prod r^2$

حيث إن ط=3.14 ∏، نق= نصف القطر r

فإذا كان قطر المجال أو الحقل الميكروسكوبي يساوي160 ميكرون

فتكون المساحة=80X 80X 3.14= 20096 ميكرون مربع

عدد المجالات أو الحقول الموجودة في1سم^{2}أي المعامل الميكروسكوبي=$\frac{1000 \times 1000 \times 10 \times 10}{20096}$

= 4976أو5000 تقريباً

ولإيجاد عدد الميكروبات في1سم^{3} من عينة الحليب يضرب المتوسط الحسابي لعدد الميكروبات في الحقل الميكروسكوبي x المعامل الميكروسكوبي 100x حيث إن كمية الحليب الموضوعة هي100/1 سم^{3}.

2- اعمل غشاء من عينة الحليب المعطاة لك وذلك باستعمال شريحة برا يد المرسوم عليها1سم^{3}، وذلك بأخذ100/1 سم^{3} من الحليب باستعمال ماصة باستير المعقمة مع ملاحظة تجفيف طرف الماصة قبل وضعه على الشريحة ثم نشره بواسطة أبرة معقمة على مساحة الـ1سم^{2} ثم جفف الشريحة على المصباح الكهربائي الذي أمامك مع مراعاة عدم إحداث تشققات بالغشاء

ملحوظة:

يمكن استعمال غمس إبرة قياسية Galibrated loop حجمها يساوي100/1سم^{3} على ألا تعقم هذه الإبرة باللهب بل تعقم بغمسها في ماء يغلي ثم تجفيفها بفوطة نظيفة معقمة.

3- ضع الشريحة في أناء به زيلول لمدة دقيقة واحدة لإزالة الدهن، جفف في الهواء ثم اغمسها في كحول 95٪ لمدة دقيقة لتثبيت الغشاء اترك الشريحة في الهواء لتجف ثم اصبغها بأزرق الميثيلين لمدة نصف دقيقة ثم اغسلها بالماء وبعد تجفيفها افحصها بالعدسة الزيتية

4- عد الميكروبات في25 مجالا واحسب العدد الكلي بالطريقة السابقة

الخطوات	الحساب
1- قطر الحقل الميكروسكوبي باستعمال العدسة الزيتية (ميكرون) 2- مساحة الحقل الميكروسكوبي للعدسة الزيتية (ميكرون مربع) . 3- عدد الحقول الميكروسكوبية في 1سم^2 . 4- المتوسط الحسابي لعدد الميكروبات في الحقل الميكروسكوبي الواحد وذلك بعد عد البكتريا . 5- عدد البكتريا في 1سم^3 .	

قد تستعمل صبغة نيومان New-mans stain مباشرة بغمر الغشاء فيها لمدة15 ثانية حيث إن تركيبها يسمح بإزالة الدهن ويثبت الغشاء وصبغ البكتريا.امل الشريحة للتخلص من الصبغة وهذا يستغرق حوالي 30 ثانية ثم تغسل بالماء ثم تجفف على المصباح الكهربائي وتفحص بالعدسة الزيتية .

وفيما يلي تركيب الصبغة :

1جرام أزرق الميثيلين

54 سم^{3}كحول الايثايل

40 سم^3 رابع كلورور الإيثان

6 سم^3 حامض خليك ثلجي.

يضاف الكحول إلى رابع كلورور الإيثان ويسخن على حمام مائي على70°م(بحيث لا يزيد عن هذه الدرجة)ثم يضاف المخلوط إلى الميثلين الأزرق ويرج إلى أن تذوب الصبغة ثم يبرد ويضاف حامض الخليك ببطء ثم يرشح.

ملحوظة:

أهم عيوب هذه الطريقة: هو ظهور الميكروبات الحية والميتة وبذلك تعطى أعداد كبيرة كما يلاحظ أن سمك الغشاء قد أهمل في الحسابات السابقة.

من أهم مزايا هذه الطريقة: السرعة في إجرائها كما أنها تعطي فكرة عن أنواع البكتريا الموجودة في الحليب وعن وجود التهاب الضرع من عدمه حيث تظهر كرات الدم البيضاء.

أسئلة

س1 :أكمل العبارات التالية:

1- الشريحة المستخدمة في العد الميكروبي تسمى - .

2- مساحة الحقل الميكروسكوبي عبارة عن- -
- -
- -
- .

3- المتوسط الحسابي لعدد الميكروبات في الحقل الميكروسكوبي يساوي- - - - - - - - - -
- -
- .

4- تغمس الشريحة في كحول 95٪ ثم تترك لمدة- - - - - دقيقة وذلك - - - - - - - -
- -
- .

5- أهم عيوب هذه الطريقة- -
- -
- .

6- أهم المزايا- -
- -
- .

المحتويات